

**VERSUCHE ZUM PROTEINUMSATZ
DER CHLOROPLASTEN KERNHALTIGER
UND KERNLOSER ZELLEN VON
ACETABULARIA MEDITERRANEA**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der
Freien Universität Berlin

von
Angela Lüttke
aus Berlin

1974

1975

**VERSUCHE ZUM PROTEINUMSATZ
DER CHLOROPLASTEN KERNHALTIGER
UND KERNLOSER ZELLEN VON
ACETABULARIA MEDITERRANEA**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der
Freien Universität Berlin

von
Angela Lüttke
aus Berlin

1974



1. Referent: Prof Dr. H. CLAUSS

2. Referent: Prof. Dr. H.-J. KÜSTER

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 1. 1975

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL und METHODE	7
2.1 Aufzucht der Pflanzen	7
2.2 Einbau von markierten Aminosäuren	7
2.2.1 Doppelmarkierung von Chloroplastenprotein mit ^{14}C - und ^3H -Leucin	7
2.2.2 Markierung von Gesamtprotein und Chloroplastenprotein mit ^{14}C -Leucin bzw. einem ^{14}C -Aminosäuregemisch	8
2.2.3 Markierung von Gesamtprotein und Chloroplastenprotein mit ^{14}C -Leucin und ^{14}C -Bicarbonat und Verfolgung der Abnahme der Radioaktivität	8
2.2.4 Markierung des Proteins isolierter Chloroplasten	9
2.3 Chloroplastenisolierung	10
2.4 Gradientenzentrifugation	11
2.5 Chlorophyllbestimmung	11
2.6 Stärkehydrolyse	12
2.7 Stärkebestimmung	12
2.8 Proteinbestimmung	12
2.9 Proteinhydrolyse	13
2.10 Radioaktivitätsmessung	13
2.11 Chemikalien	16
3. ERGEBNISSE	17
3.1 Bestimmung der relativen Turnoverrate durch Doppelmarkierung	17
3.1.1 Modellvorstellung zur Doppelmarkierung	17
3.1.2 Methodische Voraussetzungen	19
3.1.3 $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis im Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen	26

	Seite
3.2 Aminosäureeinbau in das Protein kernhaltiger und kernloser Zellen und ihrer Chloroplasten	35
3.2.1 Einbau in das Gesamtprotein und Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen	35
3.2.2 Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in kern- haltige und kernlose Zellen und Auf- trennung der Chloroplastenfraktion im Saccharosegradienten	37
3.2.3 Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in isolierte Chloroplasten und Auftrennung der Sus- pension im Saccharosedichtegradienten	45
3.2.4 Die Einbaukinetik von ^{14}C -Leucin in das Gesamtprotein und Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen	48
3.3 Bestimmung der Turnoverzeit des Proteins ganzer Zellen und ihrer Chloroplasten	53
3.3.1 Modellvorstellung zur Bestimmung der Turnoverzeit	53
3.3.2 Bestimmung der Turnoverzeit nach ^{14}C -Leucinmarkierung	57
3.3.3 Bestimmung der Turnoverzeit nach ^{14}C -Bicarbonatmarkierung	65
4. DISKUSSION	68
5. SCHLUSSFOLGERUNGEN	81
6. ZUSAMMENFASSUNG	84
7. LITERATUR	86

1. EINLEITUNG

Die ersten Versuche von Hämmerling (1931; 1932; 1934) mit der einzelligen und einkernigen Grünalge Acetabularia mediterranea zeigten bereits deutlich, daß dieses Objekt besonders geeignet ist, um Interrelationen zwischen Kern und Cytoplasma und Zellorganellen zu untersuchen.

Die Vorzüge dieses Organismus für solche Untersuchungen leiten sich von folgenden Ergebnissen ab:

- der Kern der Zelle kann leicht durch Abschneiden des Rhizoids entfernt werden (HÄMMERLING 1932)
- die Zelle überlebt die Amputation des Rhizoids mehrere Wochen (HÄMMERLING 1932)
- die kernlose Zelle zeigt ebenso wie die kernhaltige die typischen Morphogenesemerkmale - Stielverlängerung und Wirtel- und Hutbildung (HÄMMERLING 1934).

Den Versuchen über das Formbildungsvermögen kernloser Zellen und Teilstücken folgten stoffwechselphysiologische Untersuchungen, vornehmlich unter zwei Aspekten: (1) welche stoffwechselphysiologischen Leistungen kann die Zelle nach der Entfernung des Kerns generell durchführen (Übersicht s. KECK 1969); (2) welches Ausmaß erreichen die stoffwechselphysiologischen Kapazitäten der kernlosen Zelle im Vergleich zur kernhaltigen (Übersicht s. HÄMMERLING et al. 1958; HÄMMERLING 1963; SCHWEIGER 1969; PUISEUX-DAO 1970b).

Die mannigfachen Untersuchungen, die inzwischen an kernlosen Zellen verschiedener Acetabulariaarten vorgenommen wurden, gipfeln in zwei Feststellungen: (1) auch nach der Entfernung des Kerns werden die "normalen"

Stoffwechselreaktionen fortgeführt wie Atmung, Photosynthese, Proteinsynthese, um nur einige Beispiele zu nennen (Übersicht s. BRACHET et al. 1955; HÄMMERLING et al. 1958; HÄMMERLING 1963; PUISEUX-DAO 1970 b); (2) verglichen mit der kernhaltigen Zelle läßt jedoch die Intensität verschiedener Synthesen mit der Dauer der Kernentfernung nach bis zur vollständigen Sistierung. Die Korrelation zwischen abnehmender Syntheseintensität und Dauer der Kernentfernung konnte sowohl für das Gesamtprotein kernloser Zellen (VANDERHAEGHE 1954; GIARDINA 1954; BRACHET et al. 1955; CLAUSS 1958; CLAUSS und WERZ 1961) als auch für individuelle Enzymproteine (BALTUS 1959; KECK und CLAUSS 1958; CLAUSS 1959) nachgewiesen werden. Untersuchungen über die Proteinsynthese der Chloroplasten in kernlosen Zellen, kernlosen Hinterstücken und Vorderstücken (CLAUSS 1958) bestätigten die Aussagen, die über das Gesamtprotein kernloser Zellen gemacht werden konnten: die Proteinsynthese der Chloroplasten kernloser Hinterstücke ist bereits eine Woche nach der Entfernung des Kerns storniert; in den Vorderstücken ist die Proteinzunahme in den Chloroplasten zwei bis drei Wochen nach der Amputation beendet.

Überraschend demgegenüber sind die Ergebnisse über die Syntheseaktivität isolierter Chloroplasten (GOFFEAU und BRACHET 1965; GOFFEAU 1969). Der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in das lösliche und unlösliche Chloroplastenprotein findet mit gleicher Intensität statt, wenn die Chloroplasten einen oder 25 Tage nach der Kernentfernung aus den Zellen isoliert wurden. Dieses Ergebnis scheint gegen eine Kernabhängigkeit der Proteinsynthese der Plastiden zu sprechen.

Die synoptische Betrachtung dieser scheinbar konträren Ergebnisse über die Syntheseaktivität der Chloroplasten kernloser Zellen unter in vivo und in vitro Bedingungen

läßt verschiedene Möglichkeiten der Interpretation zu:

- (1) Die Intensität der Proteinsynthese der Chloroplasten wird in vivo durch einen cytoplasmatischen Faktor gehemmt, der im in vitro Experiment ausgeschaltet wäre. Es ist z. B. denkbar, daß die Syntheserate die Synthesekapazität dann unterschreitet, wenn andere Stoffwechselreaktionen in der kernlosen Zelle ebenfalls vermindert ablaufen. Die Regulationsmechanismen für die reduzierte Syntheseaktivität in "alternden" kernlosen Zellen sind bisher noch unbekannt. Aufschlüsse darüber werden u. U. die Untersuchungen bringen, die sich mit dem entgegengesetzten Prozeß befassen: der Regeneration der Acetabulariazellen, die durch Entfernung des apikalen Teils der Zelle initiiert werden kann (HÄMMERLING 1958). KLOPPSTECH und SCHWEIGER (1973 a) diskutierten kürzlich dieses Problem anhand erster Ergebnisse über die Stimulierung des ^3H -Uridineinbaus in die 80S und 70S Ribosomen der cytoplasmatischen und Chloroplastenfraktion in regenerierenden kernhaltigen Teilen. Weitere Informationen über das Signal, das dem Kern und später dem Plastidengenom den Beginn der Regeneration mitteilt, werden gleichzeitig Rückschlüsse auf den Prozeß des "Alterns" zulassen. Die Annahme, daß ein cytoplasmatischer Faktor die Proteinsynthese der Plastiden beeinflusst, wird unterstützt durch den ^{14}C -Einbau über $^{14}\text{CO}_2$ -Photosynthese in das Chloroplastenprotein ganzer Zellen und isolierter Chloroplasten (SHEPHARD und LEVIN 1972). Die Markierung des Chloroplastenproteins nach in vitro Einbau ist ca. viermal höher als nach in vivo Einbau unter gleichen Bedingungen.
- (2) Das Chloroplastenprotein unterliegt mit zunehmender Dauer der Kernentfernung einem rascheren Abbau oder Umbau, so daß bei Messung des Proteingehalts keine Nettosynthese festgestellt werden kann; auch unter dieser Annahme ist keine Veränderung der Inkorporation radioaktiver Aminosäuren in das Protein isolierter Chloro-

plasten zu erwarten, wenn sie zu verschiedenen Zeiten nach der Entfernung des Kerns den Zellen entnommen werden. Welche der aufgezeigten Möglichkeiten zutreffend ist, kann noch nicht entschieden werden.

Der Einbau exogen verabreichter Aminosäuren in das Protein isolierter Chloroplasten ist jedoch insofern nicht erstaunlich, da aufgrund plastidenspezifischer DNA (BALTUS und BRACHET 1963; GIBOR und IZAWA 1963) und RNA (SHEPHARD 1965; BALTUS et al. 1968; KLOPPSTECH und SCHWEIGER 1973 b) die Voraussetzung zu autonomer Proteinsynthese in den Plastiden gegeben ist. Der DNA-Gehalt, der mit 10^{-16} g/Plastid angegeben wird (GIBOR und IZAWA 1963; vgl. aber WOODCOCK und BOGORAD 1970), reicht jedoch nicht aus, um sämtliche Chloroplastenproteine zu codieren (BERGER 1967a; BERGER 1967). Naheliegend ist deshalb die Frage, in welchem Ausmaß die Proteinsynthese der Plastiden autonom abläuft, mit anderen Worten, welche Chloroplastenproteine an den plastidenspezifischen 70S Ribosomen codiert werden.

Einfacher scheint bisher der negative Beweis für die Autonomie der Chloroplasten, d.h. der Nachweis direkt oder indirekt kernabhängiger Proteinsynthese der Plastiden, wie er für einige Enzymproteine (SCHWEIGER et al. 1967; REUTER und SCHWEIGER 1969) und Membranproteine APEL 1970; APEL und SCHWEIGER 1972; APEL und SCHWEIGER 1973) durchgeführt wurde.

Das komplexere Problem, das sich der Frage nach dem Ausmaß der Autonomie der Chloroplasten anschließt, ist, wie die Realisation und Integration kernabhängiger und kernunabhängiger Proteinsynthese der Chloroplasten in der Zelle gesteuert werden. Aufgrund der reduzierten Zunahme des Proteingehalts der Chloroplasten kernloser Zellen einerseits, der unvermindert anhaltenden Proteinsynthese

isolierter Chloroplasten andererseits scheint der Proteingehalt der Plastiden in situ durch intrazelluläre Wechselwirkung bestimmt - unabhängig von der aktuellen Kapazität zur Proteinsynthese.

Wenn nach den Regelmechanismen zur Steuerung des Proteingehalts gefragt ist, muß berücksichtigt werden, daß zwei Prozesse - nicht nur Synthese, sondern auch Abbau - bzw. das Verhältnis beider zueinander für den Proteingehalt ausschlaggebend sind. Dementsprechend ergeben sich auch zwei Ansatzstellen für seine Kontrolle, wenn nicht der grundlegende Regulationsmechanismus in der Balance bzw. Disproportionierung beider Prozesse gesehen wird, d.h. im Turnover des Proteins.

Während eine Reihe von Arbeiten über die Synthese von Chloroplastenprotein vorliegt (Übersicht s. GOODWIN 1971; WOODCOCK und BOGGRAD 1971), existieren wenige über den Proteinabbau und seine Regulation; entsprechend gering sind auch die Informationen über die Korrelation beider Prozesse bzw. über den Turnover (Übersicht s. HUFFAKER und PETERSON 1974). Andererseits muß bereits aufgrund der geringen Anzahl gültiger Aussagen - besonders wenige liegen bisher über pflanzliche Objekte vor -, der Turnover als wichtiger Regulationsmechanismus angesehen werden, um die Intensität des Stoffwechsels dem jeweiligen Entwicklungsstand oder den Umweltbedingungen anzupassen. TREWAVAS (1972 b) konnte beispielsweise für Lemna minor zeigen, daß sich die physiologische Reaktion auf die unterschiedliche Zusammensetzung des Kulturmediums entweder nur in der Veränderung der Syntheserate oder nur der Abbaurate äußern kann, daß aber auch beide Prozesse gleichzeitig betroffen sein können. Letztlich verursacht jedoch jede der genannten Lokalisationen eine Änderung der Turnoverrate.

Gerade im nichtwachsenden Organismus scheint der Turnover der einzige Prozeß, die vorhandene Proteinausstattung veränderten Bedingungen anzupassen. Als Beispiel dafür seien die Untersuchungen über nichtwachsende Bakterienkulturen (PINE 1966; Übersicht s. MANDELSTAM 1960) und Gewebekulturen (BIDWELL et al. 1964) genannt.

In der vorliegenden Untersuchung soll geklärt werden, ob kernlose Zellen und ihre Chloroplasten von Acetabularia mediterranea, die nach zwei bis drei Wochen die Proteinnettosynthese einstellen, Proteinturnover zeigen. Es soll weiterhin untersucht werden, ob durch die Veränderung des Turnover in kernlosen Zellen verglichen mit kernhaltigen Zellen die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse über die Proteinsynthese der Chloroplasten unter in vivo und in vitro Bedingungen erklärt werden können.

2. MATERIAL und METHODE

2.1 Aufzucht der Pflanzen

Zellen von Acetabularia mediterranea wurden in Erdschreibermedium (HÄMMERLING 1963) in zwölfstündigem Licht-Dunkelwechsel angezogen. Wenn die Pflanzen eine Stiel-länge von 10 - 20 mm erreicht hatten, wurden sie zu Größenklassen mit ± 1.5 mm Toleranz selektioniert; gleichzeitig wurde bei einem Teil der Zellen das Rhizoid mit dem Kern entfernt. Bis zum Versuchsbeginn standen die Zellen auf einer Rotationsschüttelmaschine (40U/min) und wurden in zwölfstündigem Licht-Dunkelwechsel von oben bestrahlt (Lichtintensität: 1700 Lux). Das Medium wurde jede Woche gewechselt. Für die Versuche wurden stets Zellen der gleichen Nachzucht, einer Größenklasse und bei Beginn des Versuchs ohne Hut verwendet.

2.2 Einbau von markierten Aminosäuren

2.2.1 Doppelmarkierung von Chloroplastenprotein mit ^{14}C - und ^3H -Leucin

Kernhaltige und kernlose Zellen (Zeitpunkt der Rhizoid-entfernung s. Legenden der Tabellen) wurden sechs Stunden in sterilem Seewasser mit ^{14}C -Leucin inkubiert, anschließend 42 bzw. 60 Stunden in Seewasser mit ^{12}C -Leucin (0.1 %) gehalten, dann erneut sechs Stunden in Seewasser mit ^3H -Leucin inkubiert. Nach 18 bzw. 22 Stunden in Seewasser mit ^{12}C -Leucin (0.1 %) wurden die Chloroplasten isoliert. Zwischen den beiden Inkubationen mit markiertem Leucin wurde das Seewasser mit kaltem Leucin zweimal gewechselt.

Schema für die Doppelmarkierung

Dauer der Inkubation (Stunden)		Medium
6		steriles Seewasser mit ^{14}C -Leucin
42 bzw. 66		steriles Seewasser mit ^{12}C -Leucin (0.1%)
6		steriles Seewasser mit ^3H -Leucin
18 bzw. 22		steriles Seewasser mit ^{12}C -Leucin (0.1%)

2.2.2 Markierung von Gesamtprotein und Chloroplastenprotein mit ^{14}C -Leucin bzw. einem ^{14}C -Aminosäuregemisch

Für die Bestimmung der Syntheserate des Gesamtproteins und Chloroplastenproteins wurden die Zellen 1.5 bzw. 2 Stunden in sterilem Seewasser mit ^{14}C -Leucin bzw. einem ^{14}C -Aminosäuregemisch inkubiert (genaue Angaben s. Legenden der Abbildungen und Tabellen). Zu Beginn und am Ende der Inkubation wurde im aliquot des Mediums die Radioaktivität gemessen.

Um die Einbaukinetik unter konstanten Bedingungen zu verfolgen, wurde die Inkubation mit ^{14}C -Leucin gleichzeitig in fünf Parallelansätzen gestartet. Im Abstand von zwei Stunden wurde jeweils eine Probe kernhaltiger und kernloser Zellen untersucht. Parallel wurde auch hier die Abnahme der Radioaktivität im Medium gemessen.

2.2.3 Markierung von Gesamtprotein und Chloroplastenprotein mit ^{14}C -Leucin und ^{14}C -Bicarbonat und Verfolgung der Abnahme der Radioaktivität

Wenn ^{14}C -Leucin für die Proteinmarkierung verwendet wurde, wurden die Zellen in sterilem Seewasser mit der

markierten Aminosäure inkubiert (Versuch 1: 8 Stunden, Versuch 2: 6 Stunden, Versuch 3: 24 Stunden, Versuch 4: 16 Stunden) und anschließend in sterilem Seewasser mit ^{12}C -Leucin (0.1 %) gehalten. Das Medium wurde im Abstand von zwei Tagen gewechselt. Die erste Chloroplastenisolierung wurde zwischen der 6. und 72. Stunde nach Abschluß der Inkubation mit ^{14}C -Leucin durchgeführt; jeweils im Abstand von drei bis vier Tagen wurden vier bis fünf weitere Isolierungen zur gleichen Tageszeit wiederholt.

Für die Proteinmarkierung durch ^{14}C -Bicarbonatfütterung wurden die Zellen drei Tage in sterilem Seewasser mit ^{14}C -Bicarbonat im Inneneinsatz eines abgeschlossenen Gefäßes inkubiert (PAYER et al. 1969). Der Außenrand des Gefäßes enthielt einen Carbonat/Bicarbonatpuffer mit einem CO_2 -Partialdruck von 0.001 Atmosphären (WARBURG et al. 1961). Nach Inkubationsende wurde das markierte Medium im Inneneinsatz gegen frisches Seewasser ausgetauscht; Puffer im Außenrand und Medium im Inneneinsatz wurden während der Versuchsdauer mehrfach gewechselt. Dem Gesamtansatz wurden jeweils im Abstand von drei bis sechs Tagen vier Proben entnommen. Bei allen Versuchen wurden die Zellen auf einer Rotationsschüttelmaschine gehalten und von oben bestrahlt (s. Aufzucht der Pflanzen).

2.2.4 Markierung des Proteins isolierter Chloroplasten

Für die Markierung des Proteins isolierter Chloroplasten wurden 3 ml Suspension im Puffer nach GOFPEAU (1969) 1.5 h mit 20 μCi eines ^{14}C -Aminosäuregemisches (spez. Akt. 0.1mCi/ml in 0.1n HCl, uniform markiert) bei 20 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener, markierter Aminosäuren wurde nach

Abschluß der Inkubation die Suspension mit 5 ml Puffer, der 0.1 % Caseinhydrolysat enthielt, verdünnt. Die Chloroplasten wurden durch Zentrifugation (10 Minuten bei 950 g) sedimentiert und erneut in 5 ml frischem Puffer ohne Caseinhydrolysat suspendiert. Die Sedimentation wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt und die Chloroplasten, suspendiert in 0.5 ml frischem Puffer, auf einen Saccharosegradienten aufgetragen und aufgetrennt.

2.3 Chloroplastenisolierung

Direkt vor der Isolierung der Chloroplasten wurden die Zellen in frisches Seewasser übertragen und durch Pinseln von anhaftender Verunreinigung befreit. Jeweils 100 Pflanzen wurden nach kurzem Trocknen auf Filterpapier in 5 ml Puffer nach GOFTEAU (1969) in ca. 2 mm lange Teile zerschnitten und im Zentrifugenglas mit einem Glaskugelstab vorsichtig ausgequetscht. Die mit Zellwandbruchstücken vermischte Suspension wurde durch Gaze (90 μ Maschenweite) filtriert, das Filtrat 40 Sekunden bei 200 g zentrifugiert und der Überstand erneut durch Gaze (10 μ Maschenweite) filtriert. Die nunmehr grobge-reinigten Chloroplasten wurden durch Zentrifugieren (950 g, 10 Minuten) sedimentiert, der Überstand wurde verworfen. Der Chloroplastenniederschlag wurde in frischem Puffer suspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Die Suspendierung und Zentrifugation wurde einmal wiederholt, bevor die Chloroplasten in wenig Puffer suspendiert und weiterverarbeitet wurden. Alle Isolierungsschritte wurden bei 4 °C mit sterilem Puffer und Glasgerät durchgeführt.

2.4 Gradientenzentrifugation

Kontinuierlicher Saccharosedichtegradient: je 2 ml 15 %ige ($^{w/v}$) und 50 %ige ($^{w/v}$) Saccharoselösung (Lösungsmittel: Puffer nach GOFFEAU (1969) ohne Mannit) bildeten die Stammlösungen für den kontinuierlichen Gradienten. Er wurde mit ca. 0.5 ml Chloroplastensuspension überschichtet. Diskontinuierlicher Saccharosedichtegradient: aus je 2.0 ml 10 %iger, 20 %iger, 30 %iger, 40 %iger und 50 %iger gepufferten Saccharoselösung ($^{w/v}$) wurde der Gradient aufgebaut; 0.5 - 1.0 ml Chloroplastensuspension wurden aufgetragen. Der Gradient wurde 1 bzw. 3 Stunden bei 41000 g und 4 °C zentrifugiert (Christ "Omikron" Zentrifuge, 3 x 5 ml Ausschwingrotor; Beckmann L65 B, SW 41 Rotor).

Die Gradienten mit einem Volumen von ca. 4.5 ml wurden zu 13 - 15 Fraktionen, die mit einem Volumen von ca. 11 ml zu 20 - 24 Fraktionen ausgetropft. In jeder Fraktion wurde mit einem Abbe-Refraktometer die Saccharosekonzentration bestimmt, der Rest der Fraktionen wurde für die Chlorophyll-, Protein- und Stärkebestimmung und zur Radioaktivitätsmessung verwendet.

2.5 Chlorophyllbestimmung

Für die Chlorophyllbestimmung wurden 200 μ l Chloroplastensuspension mit 0.8 ml bidest. und 4 ml Aceton versetzt und 30 Minuten zur Chlorophyllextraktion und Protein-fällung bei -18 °C stehengelassen. Die Verdünnung der Suspension war notwendig, um Ausfällung des Puffers zu vermeiden. Nach dem Zentrifugieren (15 Minuten, 5000 g) wurde der Chlorophyllgehalt im Überstand nach ARNON (1949) bei 652 nm bestimmt.

2.6 Stärkehydrolyse

Da Polysaccharide die Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) stören (s. JACOBI, 1974), in einem aliquot des Reaktionsansatzes für diese Bestimmung zudem teilweise die Radioaktivität des Proteins gemessen wurde, mußte zunächst die Stärke extrahiert werden. Der nach der Pigmentextraktion zweimal mit 3 ml aqua bidest. gewaschene und anschließend getrocknete Niederschlag wurde mit 0.5 ml aqua bidest. 10 Minuten bei 90 °C angequollen, nach dem Abkühlen mit 0.5 ml Amyloglukosidaselösung (1 ml Amylo- α -1.4-1.6-glucosidase, Suspension: 20 mg/2 ml in 20 ml 0.2 m Acetatpuffer, p_H 4.8) versetzt und zwei Stunden im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Der Niederschlag nach dem Zentrifugieren wurde nach zweimaligem Waschen mit aqua bidest. für die Proteinbestimmung verwendet, der Überstand teilweise für die Bestimmung der Stärke.

2.7 Stärkebestimmung

Aus dem Überstand der Stärkehydrolyse wurde Glukose nach der Hexokinase-methode (Boehringer Monotest) bestimmt; der Stärkegehalt ließ sich aus der Glukosekonzentration durch Multiplikation mit dem Faktor 0.9 ermitteln.

2.8 Proteinbestimmung

Der Rückstand der Stärkehydrolyse wurde zweimal mit 3 ml aqua bidest. gewaschen und anschließend getrocknet, der trockene Niederschlag in 1 n NaOH gelöst und das Protein nach LOWRY et al. (1951) bei 500 nm bestimmt. Für die Konzentrationsberechnung wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin im Bereich von 10 - 100 µg aufgestellt.

2.9 Proteinhydrolyse

Der Bestimmung der Radioaktivität im Protein ging eine Hydrolyse mit dem Enzym "Pronase" (NOMOTO et al., 1960) voraus. Der gewaschene und getrocknete Rückstand nach der Pigment- und Stärkeextraktion wurde mit 1 ml Pronaselösung (0.25 mg Pronase/ml 0.025 m Trispuffer, p_H 7.5, der 10 % Äthanol und $1.88 \cdot 10^{-2}$ mM $CaCl_2$ enthielt) bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Als Hydrolysezeit haben sich 24 Stunden als ausreichend erwiesen (Tab. 1). Der Reaktionsansatz wurde anschließend zentrifugiert (30 Minuten, 5000 g) und die Radioaktivität im aliquot des Überstands gemessen.

2.10 Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivität der Proben wurde im Drei-Kanal-Liquid-Scintillation-Counter, Nuclear Chicago Mark I, gemessen. Da die Proben nach der Hydrolyse in wässriger Phase waren, wurde als Scintillationscocktail eine Toluol-Tritonmischung (TURNER, 1968) folgender Zusammensetzung gewählt: zwei Teile Toluol mit 4 % PPO und 0.1 % POPOP werden mit einem Teil Triton X-100, scintill. grade, gemischt; 10 ml Zählcocktail ergeben mit 0.2 - 1.4 ml wässriger Probe eine klare Lösung. Dieses System ist für ^{14}C - und 3H -Markierung geeignet (TURNER, 1968; TURNER 1969 a), so daß es auch für die Versuche mit Doppelmarkierung verwendet werden konnte.

Tabelle 1

Hydrolyse von Chloroplastenprotein mit dem Enzym "Pronase"

Chloroplasten aus kernhaltigen Zellen wurden nach fünf-stündiger Inkubation mit ^{14}C -Leucin isoliert und bis zur Proteinhydrolyse in üblicher Weise extrahiert. Je eine Probe mit 26 μg Protein (Ansatz A) bzw. 24 μg Protein (Ansatz B) wurden 24, 48 bzw. 72 Stunden mit dem Enzym "Pronase" bei 37 °C inkubiert. Nach der entsprechenden Zeit wurde abzentrifugiert und die Radioaktivität im aliquot des Überstands bestimmt. Angegeben sind die Zerfälle/ μg Protein (dpm/ μgP).

Hydrolyse- zeit (h)	Ansatz A dpm/ μgP	Ansatz B dpm/ $\mu\text{g P}$
24	113	102
48	111	105
72	107	107

Die Messung und Umrechnung der Zählrate in Zerfälle erfolgte bei den doppelmarkierten Proben folgendermaßen: (Instruction Manual, Nuclear Chicago 1967): die ^3H - und ^{14}C -Markierung wurde gleichzeitig in zwei getrennten Kanälen erfaßt. Der für die Tritiummarkierung eingestellte Kanal registrierte zusätzlich ca. 20 % der ^{14}C -Zerfälle, der ^{14}C -Kanal hingegen keine ^3H -Zerfälle. Die Ausbeute, mit Hilfe der Externer-Standard-Kanal-Verhältnis-Methode berechnet, betrug für ^{14}C 31 %, für ^3H 22 %. Externer Standard war eine Bariumquelle, die im dritten Kanal gemessen wurde. Grundlage für die Umrechnung der Zählrate in Zerfälle waren drei Quenchkurven: (1) ^{14}C -Kurve im ^{14}C -Kanal; (2) ^{14}C -Kurve im ^3H -Kanal; (3) ^3H -Kurve im ^3H -kanal. Die Standardproben für die Quenchkurven

hatten folgende Zusammensetzung: 10 ml Toluol-Triton Coctail, 0.5 ml aqua bidest. und 100 μ l ^3H -Toluol (41500 dpm) bzw. 100 μ l ^{14}C -Toluol (312000 dpm). Der Quencheffekt wurde durch geringe Acetonzugaben (10 - 110 μ l) verursacht.

Die Messung der Proteinhydrolysate erfolgte in gleichem Mischungsverhältnis, 10 ml Coctail : 0.5 ml Probe; der Quenchgrad war bei allen Proben annähernd gleich.

Für die Messung der ^{14}C -markierten Proteinhydrolysate wurde ebenfalls der Toluol-Triton Coctail benutzt. Für die Umrechnung der Zählrate in Zerfälle wurden zwei Auswertungsmodi getestet: (1) nach Zugabe eines internen Standards und (2) mittels einer Standardquenchkurve nach der Kanal-Verhältnis-Methode. Da die Auswertung nach beiden Methoden zum gleichen Ergebnis führte - der Quencheffekt betrug bei allen Proben 75 - 80 % - wurde die weniger aufwendige Kanal-Verhältnis-Methode angewendet.

Bei einigen Versuchen wurde die ^{14}C -Markierung direkt in einem aliquot des mit dem Folinreagens umgesetzten Proteins gemessen, so daß die Proteinkonzentration und -radioaktivität aus der gleichen Probe bestimmt wurden. Allerdings mußten die in 1n NaOH gelösten Proben zweifach verdünnt werden, damit klare Lösungen erzielt werden konnten (Probenzusammensetzung: 10 ml Toluol-Triton Coctail, 0.2 ml Probe, 0.4 ml aqua bidest.).

Der Test auf zusätzlichen Farbquench verlief negativ: es wurden Proben mit konstanten Mengen ^{14}C -Toluol gemessen, anschließend wurde jeweils ein aliquot der Reaktionssätze für die Proteineichkurve zugegeben und erneut gemessen. Die Meßreihen vor und nach Zugabe der Proteinlösungen ansteigender Farbintensität erraten

zwar etwas unterschiedliche Zählraten; der Unterschied war jedoch auf chemischen Quench durch das Lösungsmittel - Lösungsmittel für das Rinderserumalbumin der Eichkurve war 1n NaOH - zurückzuführen, wie der Vergleich mit einer ungefärbten Probe, die die gleiche Lösungsmittelmenge enthielt, zeigte.

Nach Berücksichtigung dieses Quencheffekts resultierten aus beiden Meßreihen die gleichen Zerfallsraten. Da die Photomultiplier der Scintillationscounter im blauen Spektralbereich besonders empfindlich sind, ist die Messung blaugefärbter Proben, wie bereits OLSEN et al. (1968) für die Ninhydrinreaktion nachweisen konnten, durchaus zulässig. Die erforderliche Verdünnung der Proben (s.o.) verbot die Anwendung dieses Meßverfahrens jedoch in den Versuchen, die sehr niedrige Aktivitäten aufwiesen.

2.11 Chemikalien

Amylo- α -1.4-1.6-glucosidase und der Monotest zur Glukosebestimmung wurden von Boehringer Mannheim GmbH bezogen, das Enzym "Pronase" von Serva. Das L-Leucin- ^{14}C (U) (0.1mCi/ml 0.01n HCl), L-Leucin 4.5- ^3H (N) (1mCi/ml 0.01n HCl) und das L-Aminosäuregemisch- ^{14}C (U) (0.1mCi/ml 0.1n HCl) stammten von NEN Chemicals GmbH, ebenso das PPO/POPOP als Toluolkonzentrat "Liquifluor". $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ in wäßriger Lösung (spez. Akt. 59 mCi/mM) war ein Produkt von Amersham. Triton X-100, scintill. grade, lieferte die Fa. Zinsser GmbH. Toluol und alle weiteren Chemikalien hatten p.A. Qualität und wurden von Merck bezogen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Bestimmung der relativen Turnoverrate durch Doppelmarkierung

3.1.1 Modellvorstellung zur Doppelmarkierung

Die zunächst zu beantwortende Frage war, ob der Turnover des Chloroplastenproteins kernhaltiger und kernloser Zellen überhaupt unterschiedlich ist. Der Begriff "Turnover" ist hier im umfassenden Sinn gebraucht, als ein dynamischer Prozeß, dessen Ursache in Synthese und Abbau einer Substanz zu sehen ist.

Dem nach ARIAS et al. (1969) modifizierten Versuchsansatz liegen folgende Überlegungen zugrunde: Proteine, die einem raschen Turnover unterliegen, werden einerseits schnell synthetisiert, andererseits auch rasch abgebaut. Aus diesem Gedanken ergeben sich zwei Bestimmungsmöglichkeiten: (1) Hohe Syntheserate müßte sich in hoher spezifischer Aktivität bei Kurzzeitmarkierung bemerkbar machen; (2) der rasche Abbau kann erfaßt werden, wenn nach Pulsmarkierung die Geschwindigkeit der Abnahme der Radioaktivität über einige Zeit verfolgt wird. Die nach ARIAS et al. (1969) vorgeschlagene Bestimmungsmethode vereinfacht die zweite Möglichkeit folgendermaßen: die gleiche Aminosäure wird zunächst mit ^{14}C -Markierung, einige Zeit später mit ^3H -Markierung gefüttert. Kurz nach Abschluß der zweiten Inkorporation wird im Protein das Verhältnis der $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Markierung bestimmt. Proteine mit schnellerer Abbaurrate sind durch ein höheres $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis ausgezeichnet als Proteine mit langsamerer Abbaurrate.

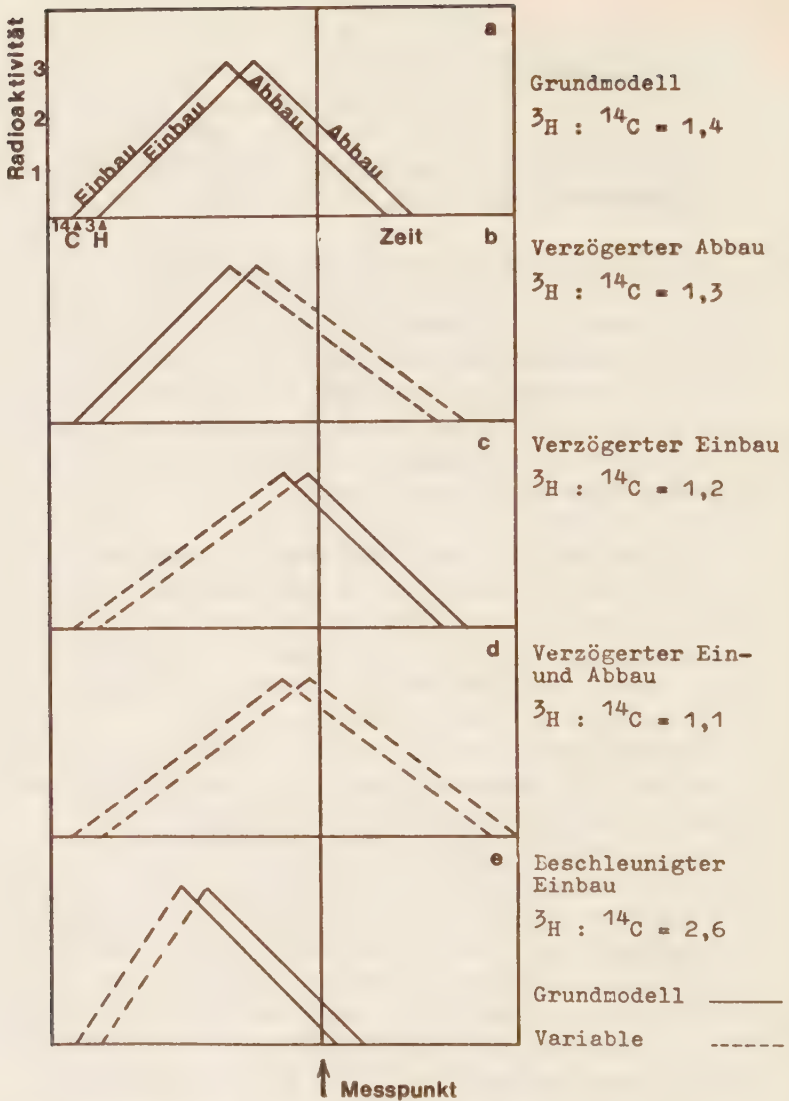


Abb. 1: Schematische Darstellung zur Messung des relativen Turnover durch Doppelmarkierung. Im Grundmodell (a) ist gleiche Einbau- und Abbaurrate angenommen und für das Verhältnis von $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ der relative Wert 1,4 berechnet; die Veränderung der Einbau- oder Abbaurrate oder beider Faktoren (b-e) verursacht eine entsprechende Verschiebung des relativen Wert zu einem niedrigeren oder höheren Quotienten gegenüber dem Grundmodell.

Abb. 1 stellt das Grundmodell dieses Versuchsansatzes und einige mögliche Varianten schematisch dar; das Ausgangsmodell (Abb. 1a) ist auf die einfachste Möglichkeit reduziert, Einbau und Abbau sind als aufsteigende und abfallende Geraden dargestellt. Das $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis, in relativer Einheit angegeben, ist die Basis für den Vergleich, wenn eine der Variablen verändert wird. Wenn Einbau, Abbau oder beide Prozesse gegenüber dem Grundmodell verzögert ablaufen, erniedrigt sich das $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis mehr oder weniger stark (Abb. 1b-d). Umgekehrt steigt der Quotient bei beschleunigtem Einbau an (Abb. 1e).

Die Modelle zeigen, daß bei einer vergleichenden Untersuchung nur festgestellt werden kann, ob der Turnover sich unterscheidet. Die Information, welcher der beteiligten Prozesse - Synthese, Abbau oder beide - den unterschiedlichen Turnover hervorrufen, muß auf andere Weise geklärt werden.

3.1.2 Methodische Voraussetzungen

Die Anwendung dieses Modells erfordert verschiedene Voraussetzungen:

- (1) Das zu messende Isotopenpaar muß sich deutlich in seinem Energiespektrum unterscheiden. Diese Bedingung ist durch die Anwendung von ^3H - und ^{14}C -markiertem Leucin erfüllt.
- (2) Da im ^3H -Kanal neben ^3H -Zerfällen auch ^{14}C -Zerfälle registriert werden (TURNER 1969 b), muß die markierte Substanz in einem Zustand gemessen werden, der eine sichere Umrechnung der Zählrate in Zerfälle ermöglicht. Zweiphasensysteme, wie Suspension oder Filterpapier, sind für die Messung doppelmarkierter Proben ungeeignet,

da bei ^3H - und ^{14}C -markierten Verbindungen unterschiedliche Anteile durch Selbstabsorption verloren gehen. Dies zeigt sich deutlich, wenn ^3H - und ^{14}C -Leucin bekannter Radioaktivität auf Filterpapier gemessen und die Ausbeute vergleichsweise berechnet und Standardquenchkurven entnommen wird. Für ^{14}C ergab sich in einem entsprechenden Versuch 40 % Ausbeute aus der Rechnung und 65 % aus der Quenchkurve, für ^3H entsprechend 5 % bzw. 26 %.

Um das Chloroplastenprotein in homogener Phase zu bestimmen, wurde das Protein zunächst hydrolysiert und das wäßrige Hydrolysat im Toluol-Triton Cocktail gemessen. Dieses Scintillationsgemisch ist für ^3H - und ^{14}C -Markierungen gleichermaßen anwendbar (TURNER 1968; TURNER 1969a). Die Auswertung über das Externer-Standard-Kanal-Verhältnis (Instruction Manual, Nuclear Chicago 1967) ist jedoch nur dann zulässig, wenn die Quenchkurven mit Proben im gleichen Scintillationsgemisch und gleichen Mischungsverhältnis aufgestellt werden.

(3) Isotopendiskriminierung muß ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung dieses möglichen Effekts, wurden die Zellen gleichzeitig mit ^3H - und ^{14}C -Leucin inkubiert und anschließend die Chloroplasten isoliert. Um die Chloroplastensuspension weitgehend von cytoplasmatischer Verunreinigung zu befreien (LAYCOCK et al. 1966), wurde sie im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt und fraktioniert. In jeder Fraktion wurde der Chlorophyllgehalt und die Proteinmarkierung bestimmt. Wie aus Abb. 2 ersichtlich, zeigen die ^3H - und ^{14}C -Markierung das gleiche Profil. Aufgrund der guten Koinzidenz der Radioaktivität darf Isotopendiskriminierung ausgeschlossen werden.

(4) Die Zeitfolge für die beiden Inkubationen mit markierten Aminosäuren und die Isolierung der Chloroplasten muß so gewählt werden, daß Abbau- bzw. Umbauprodukte

verbunden mit Wiedereinbau die Messung nicht verfälschen. Zur Lösung dieses Problems sind zwei Alternativen denkbar:

(a) Die verschieden markierten Aminosäuren werden in sehr kurzem Abstand gefüttert und kurz nach der zweiten Inkubation werden die Chloroplasten isoliert. Da bei Acetabularia jedoch die Aminosäuren nur sehr langsam eingebaut werden (CHAUDURI und SPENCER 1968), kommt diese Möglichkeit nicht in Betracht.

(b) Zwischen den beiden Inkubationen und nach der zweiten Inkubation mit radioaktivem Material wird das Medium mit derselben ^{12}C -Aminosäure im Überschuß versetzt, so daß Umbau und gleichzeitig Wiedereinbau der markierten Substanz weitgehend zurückgedrängt werden (RACUSEN und FOOTE 1960).

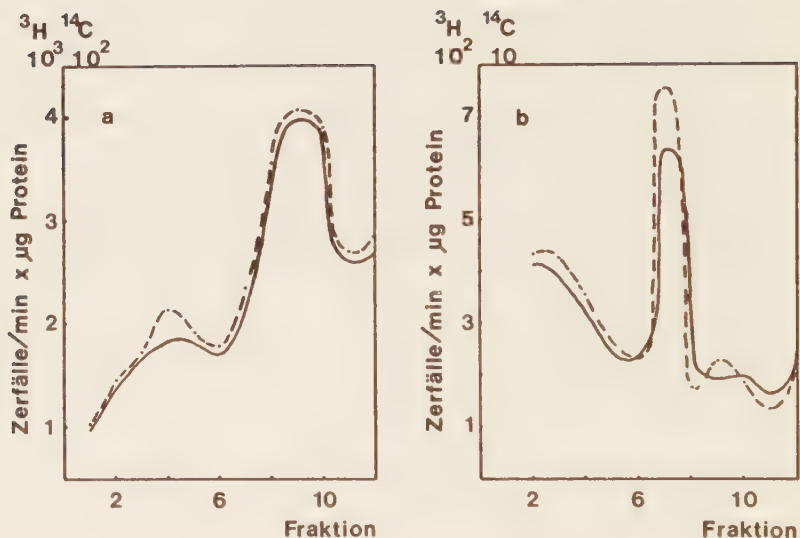


Abb. 2 a, b ^3H - und ^{14}C -Markierung des Chloroplastenproteins nach gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit ^3H - und ^{14}C -Leucin und Auftrennung der Chloroplastensuspension im Saccharosegradienten.

- a Zellen mit Kern
 b Zellen ohne Kern
 — ^{14}C -Markierung
 - - ^3H -Markierung

Der Zusatz der kalten Aminosäure vermag zwar den Wiedereinbau in das Protein herabzusetzen, die Markierung anderer Substanzen während der Inkubation ist jedoch nicht auszuschließen. So konnte beispielsweise Radioaktivität auch in der Stärke nachgewiesen werden.

Wenn die Chloroplastensuspension nach der Inkubation unter Standardbedingungen (s. Material u. Methoden) im Saccharosegradienten aufgetrennt wurde (Abb. 3), verlief die ^3H - und ^{14}C -Markierung ebenso parallel wie bei gleichzeitiger Inkubation mit ^3H - und ^{14}C -Leucin (vgl. Abb. 2). Kontamination mit anderen Substanzen und unterschiedlicher Metabolismus der beiden Tracer ließe jedoch unterschiedliche Gradientenprofile für die sukzedan verabreichten Aminosäuren erwarten. Der für den Standardansatz gewählte größere Zeitintervall zwischen den Inkubationen scheint demzufolge zulässig.

Die Proteinnettosynthese der kernlosen Zellen und ihrer Chloroplasten läßt mit der Dauer der Kernentfernung nach (CLAUSS 1958; CLAUSS und WERZ 1961), zwei bis drei Wochen nach der Amputation - offensichtlich abhängig von der Zellgröße bei der Kernentfernung - ist keine Nettosynthese mehr festzustellen. Um den Proteinturnover innerhalb dieses Zeitraums zu messen, sind wenigstens zwei Inkubations- und Isolierungsvorgänge (eine Woche und 14 oder 21 Tage nach der Entfernung des Kerns) notwendig. Parallel müssen jeweils gleichalte kernhaltige Zellen untersucht werden. Hier stellte sich die Frage, ob der Materialaufwand unter Verzicht auf Parallelsätze reduziert werden kann. Die Übereinstimmung der Ergebnisse wurde im Doppelansatz getestet; verglichen wurde das $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis in den Chlorophyllmaxima nach Auftrennung der Suspension im Saccharosegradienten und in den beiden Ausgangssuspensionen.

Obgleich die ^3H : ^{14}C -Werte nicht im optimalen Bereich liegen, (OKITA et al. 1957), stimmen sie soweit überein, daß auf Parallelansätze verzichtet werden konnte (Tab. 2).

Tabelle 2

Doppelmarkierung von Chloroplastenprotein mit
 ^{14}C - und ^3H -Leucin

In zwei Parallelansätzen (A und B) wurden je 200 kernhaltige Zellen 6 Stunden mit ^{14}C -Leucin (0.625 $\mu\text{Ci/ml}$; spez. Akt. 305mCi/mM) und 66 Stunden später 6 Stunden mit ^3H -Leucin (0.5 $\mu\text{Ci/ml}$; spez. Akt. 30 Ci/mM) inkubiert. Nach weiteren 22 Stunden in kaltem Medium wurden die Chloroplasten isoliert und die Suspension im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Tabelliert sind die Werte für die Ausgangssuspension und für die Gradientenfraktionen mit dem höchsten Chlorophyllgehalt.

^3H : ^{14}C - Verhältnis (dpm ^3H /dpm ^{14}C)		
Probe	Ansatz A	Ansatz B
Ausgangssuspension	0.50	0.40
Gradientenfraktion	0.47	0.58

Nicht zuletzt stellte sich das Problem der Reinheit der Chloroplastensuspension, dem - nicht nur aus methodischer Sicht - für die Beurteilung der vorliegenden Meßdaten grundlegende Bedeutung zukommt. Zwei konkurrierende Überlegungen beeinflussten die Wahl der Isolierungsmethode:

(1) Für die vergleichende Untersuchung von Chloroplasten aus kernhaltigen und kernlosen Zellen sollen die Chloroplastensuspensionen weitgehend repräsentativ sein. Dies bedeutet aber, daß die Isolierung mit möglichst geringen Verlusten vorgenommen werden muß.

(2) Die Chloroplastensuspensionen mußten von cytoplasmatischen Verunreinigungen befreit werden, bei Acetabularia aufgrund der 'Cytoplastenbildung' (BIDWELL 1972) ein im Vordergrund stehendes Problem bei vielen Experimenten mit isolierten Chloroplasten (WOODCOCK und BOGORAD 1971).

Als Kompromiß für die divergierenden Voraussetzungen bot sich an, die Suspension im Saccharosedichtegradienten zu reinigen und die Werte der Gradientenfraktionen mit denen der Ausgangssuspensionen zu vergleichen. Dadurch wurde einerseits die cytoplasmatische Verunreinigung reduziert, andererseits die unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit der Chloroplasten aus kernhaltigen und kernlosen Zellen (SHEPHARD 1965 b) berücksichtigt.

Im Gegensatz zum zweigipfligen Gradientenprofil von Vicia faba-chloroplasten (LAYCOCK et al. 1966) und Spinatchloroplasten (LYTTLETON et al. 1971; SCHAEI und LÜTTKE unveröff.) zeigen unter gleichen Zentrifugationsbedingungen Acetabularia-chloroplasten stets ein mehrgipfliges Profil, beim Saccharosestufengradient stärker ausgebildet als beim kontinuierlichen Saccharosegradienten (COOPER und BEEVERS 1969; SCHAEI und LÜTTKE unveröff., s. HARWOOD 1974). Unter Berücksichtigung

der oben dargelegten Problematik bei einer vergleichenden Untersuchung schien es sinnvoll, die Chloroplasten der Hauptmaxima, obwohl bei unterschiedlicher Dichte im Gradienten angereichert, als repräsentativ zu betrachten (s. SHEPHARD 1965 b).

3.1.3 $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis im Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen

In den folgenden Versuchen wurden die Konzentrationen des markierten Leucin so gewählt, daß das $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis zwischen 1 und 10 lag. In diesem Bereich kann die Umrechnung in Zerfälle mittels der Externen-Standard-Kanal-Verhältnis-Methode mit größter Sicherheit angewendet werden (OKITA et al. 1957).

Jede Versuchsreihe begann mit Zellen eine Woche nach der Entfernung des Kerns, da aufgrund der Proteinbestimmungen (CLAUSS 1958; CLAUSS und WERZ 1961) erst von diesem Zeitpunkt an Unterschiede zwischen kernhaltigen und kernlosen Zellen sichtbar werden. Zwei bzw. drei Wochen später wurde der Versuchsansatz mit Zellen aus gleicher Kultur wiederholt; bei allen Versuchen wurden gleichalte Zellen mit Kern parallel untersucht.

Die Ergebnisse des ersten Experiments sind in Tab. 3 zusammengefaßt; gemessen wurde die Markierung der Gesamtsuspension der Chloroplasten. Bei der zweiten Inkubation wurde zusätzlich zwischen Zellen mit und ohne Hut unterschieden. In beiden Inkubationsserien ist ein rascherer Turnover im Chloroplastenprotein kernloser Zellen angedeutet, nach drei Wochen unabhängig davon, ob die Hutbildung bereits eingesetzt hat.

Tabelle 3

$^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis im Chloroplastenprotein
kernhaltiger und kernloser Zellen

Je 50 Zellen wurden in 20 ml Seewasser mit ^{14}C -Leucin ($0.1 \mu\text{Ci/ml}$; spez. Akt. 305 mCi/mM) und 66 Stunden später mit ^3H -Leucin ($1 \mu\text{Ci/ml}$; spez. Akt. 30 Ci/mM) je 6 Stunden inkubiert. Die erste Inkubation begann eine Woche nach Entfernung des Kerns (Länge der Zellen bei Kernentfernung 9 - 11 mm), die zweite Inkubation zwei Wochen später; parallel wurden jeweils gleichalte kernhaltige Zellen inkubiert. Nach Isolierung und Extraktion der Chloroplasten wurde die ^3H - und ^{14}C -Markierung des Proteins der Gesamtsuspension bestimmt und die Meßwerte (cpm) in Zerfälle (dpm) umgerechnet.

$^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis ($\text{dpm}^3\text{H}/\text{dpm}^{14}\text{C}$)		
Woche nach Kernentfernung	Kernhaltige Zellen	Kernlose Zellen
1	1.15	2.50
2 (ohne Hut)	3.20	4.50
2 (mit Hut)	2.60	4.75

Wegen der besonderen Problematik bei der Isolierung von Chloroplasten aus Acetabularia wurde bei den zwei folgenden Versuchen die Chloroplastensuspension im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Es wurde das $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis in der Ausgangssuspension und über den gesamten Gradienten bestimmt, für den Vergleich des relativen Turnover im Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen jedoch nur die Werte der Ausgangssuspension und der Chloroplasten in den Chlorophyllmaxima des Gradienten herangezogen (Tab. 4, Abb. 3a-d).

Tabelle 4

^3H : ^{14}C -Verhältnis im Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen

Je 200 Zellen wurden 6 Stunden in Seewasser mit ^{14}C -Leucin (0.4 $\mu\text{Ci/ml}$; spez. Akt. 305 mCi/mM) und 42 Stunden später 6 Stunden in Seewasser mit ^3H -Leucin (5 $\mu\text{Ci/ml}$; spez. Akt. 42.7 Ci/mM) inkubiert. Die Inkubation begann jeweils eine Woche nach Entfernung des Kerns. Im Versuch 1 waren die Zellen zu diesem Zeitpunkt 22 - 28 mm lang, im Versuch 2 15 - 17 mm lang. Parallel wurden gleichalte Zellen mit Kern inkubiert. Nach der Isolierung der Chloroplasten wurde die Suspension im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt und nach Fraktionierung das Protein isoliert. Tabelliert sind die Werte für die Ausgangssuspension und die Gradientenfraktionen mit dem höchsten Chlorophyllgehalt.

^3H : ^{14}C -Verhältnis (dpm ^3H /dpm ^{14}C)					
	Woche nach Kernent-	Kernhaltige Zellen	Kernlose Zellen		
	fernung	Ausgangs-	Gradienten-	Ausgangs-	Gradienten
		suspension	fraktion	suspension	fraktion
Ver-	1	11.06	2.82	15.26	5.72
such					
Nr.1	2	8.93	3.12	27.06	9.30
Ver-	1	1.57	0.82	3.13	2.42
such					
Nr.2	2	3.15	2.48	4.27	5.45

Auch in diesen beiden Versuchen hat das Chloroplastenprotein kernloser Zellen stets ein höheres $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis als das kernhaltiger Zellen. Für die überraschend stark abweichenden Werte der Ausgangssuspensionen im ersten Versuch wären als Ursachen denkbar:

(1) Die Annahme, die Chloroplasten in den Chlorophyllmaxima der Gradienten sind repräsentativ, ist unzutreffend. Für den Vergleich mit der Ausgangssuspension müssen auch die Werte in den anderen - in diesem Versuch weit weniger deutlichen - Chloroplastenzonen im Gradienten berücksichtigt werden. Da jedoch keine andere Fraktion ein annähernd gleiches $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis wie die Ausgangssuspension hat, scheidet dieser Grund aus. Unberücksichtigt blieb allerdings bei allen Messungen das Sediment des Gradienten, in dem sich bei kernhaltigen Zellen ca. 30 % der aufgetragenen Chlorophyllmenge befinden, bei kernlosen Zellen ca. 45 %. Es dürfte sich hier vorwiegend um 'Cytoplasten' mit großen Chloroplasten mit hohem Stärkegehalt handeln, deren Anteil erwartungsgemäß bei kernlosen Zellen höher ist.

(2) Kontamination der Ausgangssuspension durch Cytoplasma und/oder Mikroorganismen. Obwohl nicht mit Sterilkulturen gearbeitet wurde, waren die Zellen durch Pinseln und häufiges Umsetzen in frisches Medium soweit gesäubert, daß sich nach Suspensionsausstrichen auf Agarplatten vernachlässigbare Kontamination zeigte. Die Angaben für cytoplasmatische Verunreinigungen von Chloroplastenpräparaten aus verschiedenen Objekten schwanken zwischen 5 - 15 % (THALACKER und PEHRENS 1959; HERER 1960; BIRD et al. 1973) je nach Isolierungstechnik. Ähnliche Werte, die aufgrund der Aktivität der Pyruvatkinase in den Präparationen gemacht wurden (HERER et al. 1967; SANTARIUS und STOCKING 1969; RITENOUR et al. 1967), lassen sich für Chloroplastenpräparate aus Acetabularia noch nicht bestätigen, da die Enzymaktivität bei diesem

Objekt schwer meßbar ist (WINKENBACH et al. 1972; LÜTTKE und SCHÄEL unveröff.). Der Vergleich des Einbaus markierter Aminosäuren in die Ausgangssuspension und die Fraktionen des Saccharosegradienten (s. Ergebnisse 3.2.2 und 3.2.3) läßt jedoch höhere Werte für die Gesamtsuspension vermuten. Besondere Schwierigkeiten bei der Chloroplastenisolierung ergeben sich bei den Zellen zwei bis drei Wochen nach der Kernentfernung; kernlose Zellen in diesem Stadium lassen sich beispielsweise schwerer auszentrifugieren als kernhaltige Zellen. Durch ihre verdickten Zellwände (WERZ 1957) sind Chloroplasten und Cytoplasma zusammengepreßt und vermutlich noch stärker miteinander verhaftet als ohnehin bei diesem Objekt (WOODCOCK und BOGORAD 1971).

Trotz dieser Unsicherheit deuten die Meßdaten der Versuche darauf hin, daß unter den gewählten Bedingungen der Turnover im Chloroplastenprotein kernloser Zellen höher ist als in kernhaltigen Zellen.

Nach den anfangs dargestellten vereinfachten Modellvorstellungen (Abb. 1) sind drei Reaktionsmechanismen als Ursache denkbar: (1) beschleunigter Einbau; (2) beschleunigter Abbau; (3) beschleunigter Ein- und Abbau. Die folgenden Experimente versuchen, dieser Frage Aufklärung zu geben.

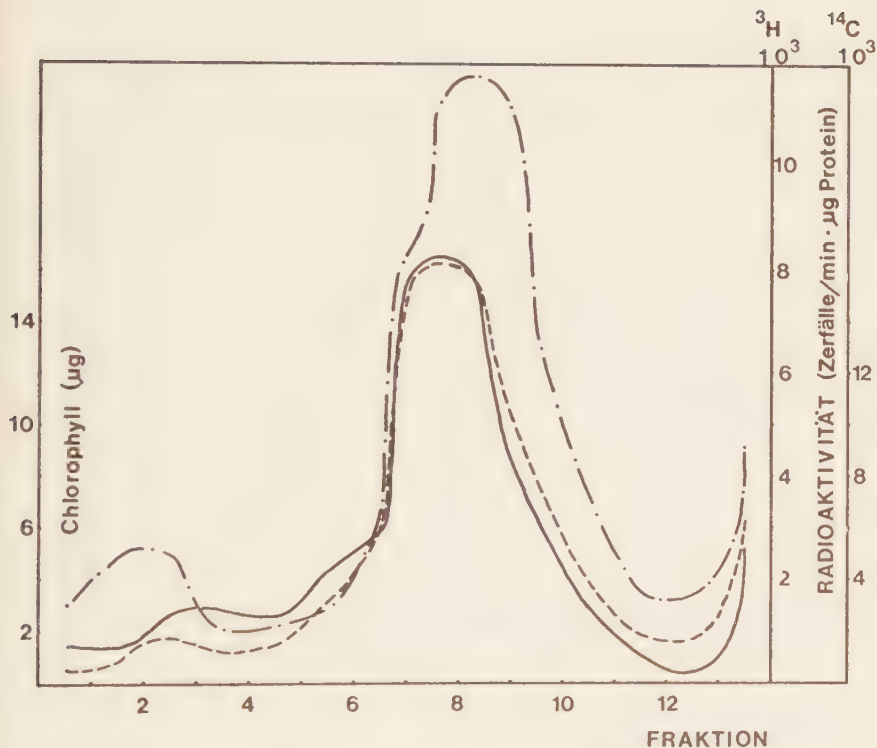


Abb. 3a: ^3H - und ^{14}C -Markierung des Chloroplastenproteins nach sukzedaner Inkubation der Zellen mit ^3H - und ^{14}C -Leucin und Auftrennung der Chloroplastensuspension im Saccharosegradienten (s. Tab. 4, Versuch 2); Zellen mit Kern (1).

Chlorophyll ———
 ^3H -Markierung - · -
 ^{14}C -Markierung ----

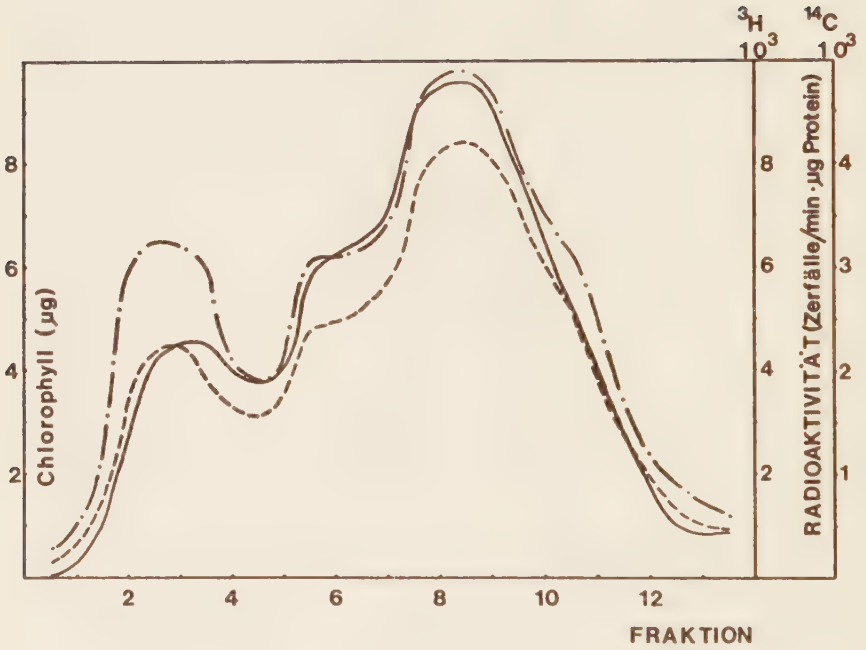


Abb. 3b. Angaben wie zu Abb. 3a;
Zellen ohne Kern (1)

Chlorophyll ———
 ^3H -Markierung -.-.-
 ^{14}C -Markierung -----

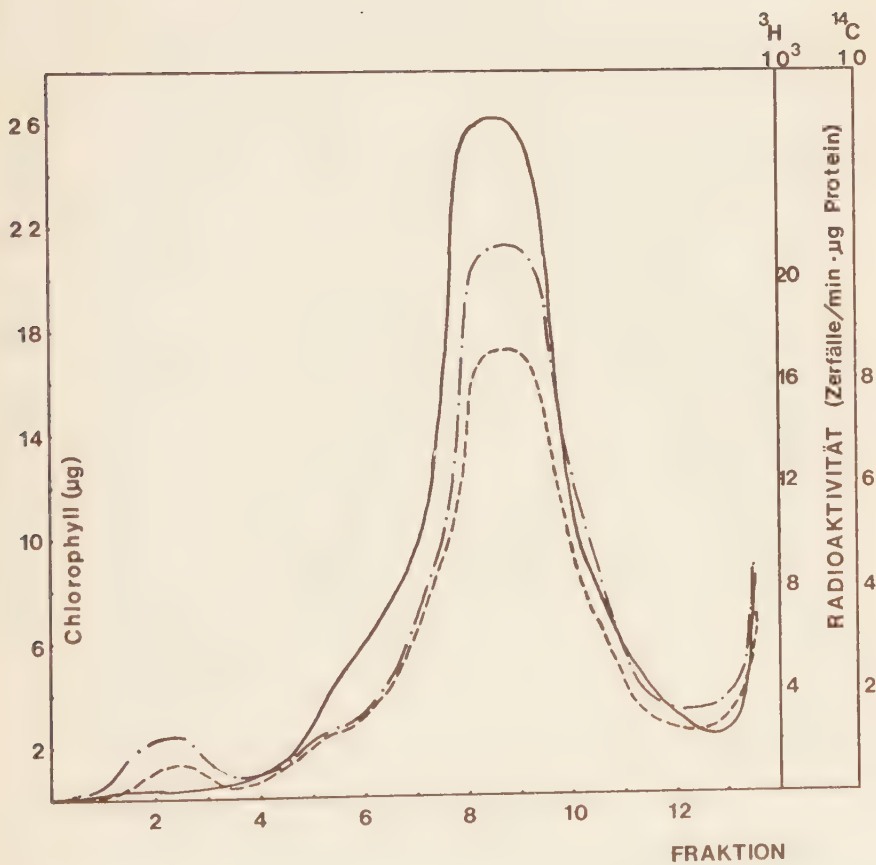


Abb. 3c. Angaben wie zu Abb. 3a;
Zellen mit Kern (2)

Chlorophyll ———
 ^3H -Markierung - · - · -
 ^{14}C -Markierung ----

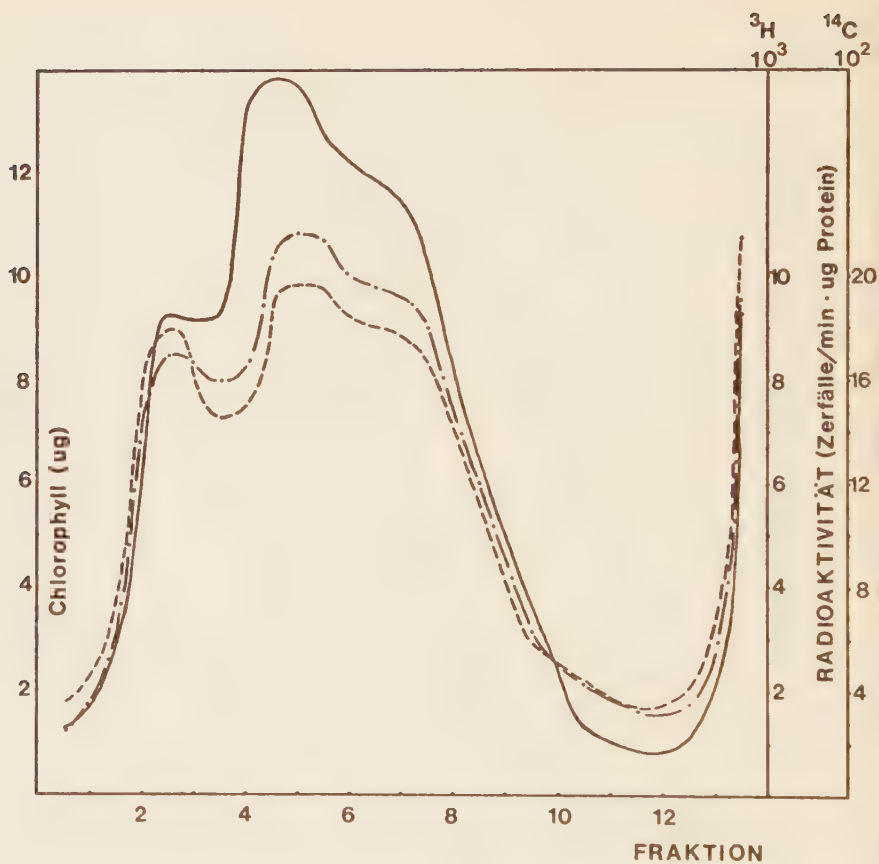


Abb. 3d. Angaben wie zu Abb. 3a;
Zellen ohne Kern (2)

Chlorophyll ———
 ^3H -Markierung - · - · -
 ^{14}C -Markierung - - - -

3.2 Aminosäureeinbau in das Protein kernhaltiger und kernloser Zellen und ihrer Chloroplasten

3.2.1 Einbau von ^{14}C -Leucin in das Gesamtprotein und Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen

Um Aufschluß über die Proteinsyntheserate zu erhalten, wurde die spezifische Aktivität des Proteins ganzer Zellen und ihrer Chloroplasten nach Kurzzeitmarkierung bestimmt.

Aus Tab. 5 ist ersichtlich, daß die Markierung des Proteins kernloser Zellen vier Wochen nach der Kernentfernung 70 % der Markierung kernhaltiger Zellen beträgt; der gleiche Prozentsatz ergibt sich bei den Werten für das Chloroplastenprotein kernloser Zellen. Andererseits macht bei kernhaltigen und kernlosen Zellen die Proteinmarkierung der Chloroplasten jeweils nur 15 % der gesamten Proteinmarkierung aus. Der vergleichsweise starke Einbau in "nicht-Chloroplastenprotein" macht erneut die Notwendigkeit deutlich, mit weitgehend cytoplasmafreien Chloroplastensuspensionen zu arbeiten.

Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten wurde deshalb im folgenden Versuch die nach der üblichen Methode gewonnene Chloroplastenfraktion im Saccharosegradienten weiter gereinigt.

Tabelle 5

Einbau von ^{14}C -Leucin in das Gesamtprotein und Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen

90 Zellen mit Kern und 100 Zellen ohne Kern (vier Wochen nach der Kernentfernung) wurden 2 Stunden in 20 ml Seewasser mit ^{14}C -Leucin ($0.28 \mu\text{Ci/ml}$; spez. Akt. 280 mCi/mM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Seewasser mit ^{12}C -Leucin abgespült; 30 Zellen wurden homogenisiert; aus den übrigen Zellen wurden die Chloroplasten isoliert. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde die spezifische Aktivität des Proteins ($\text{Zerfälle} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$) im Zellhomogenat und in den Chloroplasten bestimmt. Aus der Messung der Radioaktivität im Medium zu Beginn und am Ende der Inkubation wurde die Aufnahme pro Zelle berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei Parallelansätzen.

	Kernhaltige Zellen		Kernlose Zellen	
Aufnahme/Zelle (μMol)	1.38×10^{-5}		2.8×10^{-6}	
	Homogenat		Plastiden	
spez. Akt. ($\text{Zerfälle} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$)	581	89	407	63

3.2.2 Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in kernhaltige und kernlose Zellen und Auftrennung der Chloroplastenfraktion im Saccharosedichtegradienten

Die Auftrennung der Chloroplastenfraktion im Saccharosedichtegradienten diente der Beantwortung von zwei Fragen: (1) entspricht die spezifische Aktivität des Proteins der Gesamtsuspension derjenigen der Chloroplastenfraktionen im Gradienten; (2) unterscheidet sich die spezifische Aktivität zwischen den Chloroplastenfraktionen des Gradienten.

In dieser Versuchsserie wurden dreimal im Abstand von einer Woche kernhaltige und kernlose Zellen 1.5 Stunden mit ^{14}C -markierten Aminosäuren inkubiert. Für die Verwendung eines ^{14}C -Aminosäuregemischs an Stelle von ^{14}C -Leucin sprach, daß durch das gleichzeitige Angebot verschiedener Aminosäuren höhere Markierung erreicht wird. Dieser Gesichtspunkt ist bei diesem Versuchsansatz besonders wichtig, da durch die Auftrennung der Gesamtfraction im Gradienten die Radioaktivität auf ein größeres Volumen verteilt wird. Für eine saubere Auftrennung kann andererseits bei gegebenem Rotorvolumen (12 ml/Röhrchen) die auftragbare Suspensionsmenge nicht beliebig vergrößert bzw. konzentriert werden.

Das Ergebnis dieser Versuchsserie zeigt, daß keine Übereinstimmung in der spezifischen Aktivität des Proteins zwischen Ausgangssuspension und Chloroplastenfraktionen im Gradienten besteht (Tab. 6). Die Werte der Gesamtfractionen sind stets höher als die der Gradientenfraktionen. Zwei Faktoren scheinen den starken Einbau in "nicht-Chloroplastenprotein" zu bewirken; einmal die cytoplasmatische Verunreinigung per se, darüberhinaus die scheinbar größere Synthesegeschwindigkeit dieses Anteils, die allerdings mit zunehmendem Alter nachzulassen scheint.

Tabelle 6

Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in das Chloroplastenprotein
kernhaltiger und kernloser Zellen

Je 400 Zellen (in der 3. Woche 300 kernhaltige Zellen) und je 400 kernlose Zellen (Zelllänge bei der Kernentfernung 11 - 14 mm) wurden 1.5 Stunden in 50 ml Seewasser mit einem ^{14}C -Aminosäuregemisch (0.2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$; uniform markiert) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Seewasser mit ^{12}C -Aminosäuren abgespült, die Chloroplasten isoliert, die Chloroplastensuspension im diskontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt und die Fraktionen in üblicher Weise aufgearbeitet. Tabelliert ist die spezifische Aktivität in Zerfälle $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$ ($\text{dpm}/\mu\text{gP}$) des Proteins der Ausgangssuspension und der Chlorophyllmaxima der Gradienten mit den entsprechenden Saccharosekonzentrationen; x) Ausgangssuspension; außerdem die Aufnahme pro Zelle, berechnet aus der Abnahme der Markierung im Medium.

Woche nach Kern-entf.	Zellen mit Kern			Zellen ohne Kern		
	Sacch. (%)	spez. Akt. $\text{dpm}/\mu\text{g P}$	Aufnahme $\mu\text{Ci}/\text{Zelle}$	Sacch. (%)	spez. Akt. $\text{dpm}/\mu\text{g P}$	Aufnahme $\mu\text{Ci}/\text{Zelle}$
1	- x)	634	1.5	- x)	310	0.75
	43.5	69		43.8	48	
	35.8	79		38.6	60	
	29.5	104		32.6	48	
	22.6	103		22.3	-	
	15.1	159		15.0	68	
2	- x)	186	1.7	- x)	286	1.3
	45.5	57		45.5	30	
	38.0	37		38.1	27	
	32.4	41		32.1	26	
	25.1	72		24.6	-	
3	- x)	123	1.7	- x)	106	0.5
	50.7	62		50.7	17	
	44.9	62		44.9	24	
	40.2	34		40.2	23	
	32.4	51		32.5	43	
	20.2	87		20.3	30	

Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits für den ^3H -Uridineinbau in die 80S Ribosomen des Cytosols gemacht werden (KLOPPSTECH und SCHWEIGER 1973 c). Die Syntheserate dieser Partikel ist in jungen Zellen höher als in älteren.

Weitere Schlußfolgerungen ergeben sich gleichzeitig aus diesem Ergebnis für den Einbaumechanismus bei längerer Inkubation mit radioaktiven Aminosäuren: die Markierung des Chloroplastenproteins ist nicht auf der direkten Einbau der Aminosäure zurückzuführen; ein u.U. nicht unwesentlicher Anteil wird über die 'Barriere' Cytoplasma - vielleicht über entsprechende Umbauprodukte - eingeführt (BIDWELL et al. 1964).

Die zweite Frage hinsichtlich unterschiedlicher spezifischer Aktivität der Chloroplastenfraktionen innerhalb eines Gradienten kann nicht endgültig beantwortet werden. In den Chlorophyllpeaks der kernlosen Zellen ergeben sich keine größeren Abweichungen; bei den kernhaltigen Zellen tendiert der leichteste Peak zu höherer spezifischer Aktivität, besonders deutlich in der ersten Woche der Versuchsserie. Diese Werte scheinen aber auch hier wiederum durch den Einbau in "nicht-Chloroplastenprotein" erhöht, wie er in den leichtesten Fraktionen (s. Fraktionen 23, 24; Abb. 4a-f) des "kernhaltigen" und "kernlosen" Gradienten deutlich manifestiert ist. Bei allen Gradienten verlaufen das Profil der ^{14}C -Markierung und des Chlorophylls parallel, nur in den beiden leichtesten Fraktionen gehen die beiden Parameter stark auseinander (Abb. 4a-f). Die spezifische Aktivität dieser Fraktionen ist höher als in den Chlorophyllpeaks, niedriger jedoch als in der Ausgangssuspension. Die spezifische Aktivität für Fraktion 23 des Gradienten in der ersten Woche bei kernhaltigen Zellen betrug beispielsweise 199 dpm/ μg Protein; bei kernlosen Zellen entsprechend 82 dpm/ μg Protein.

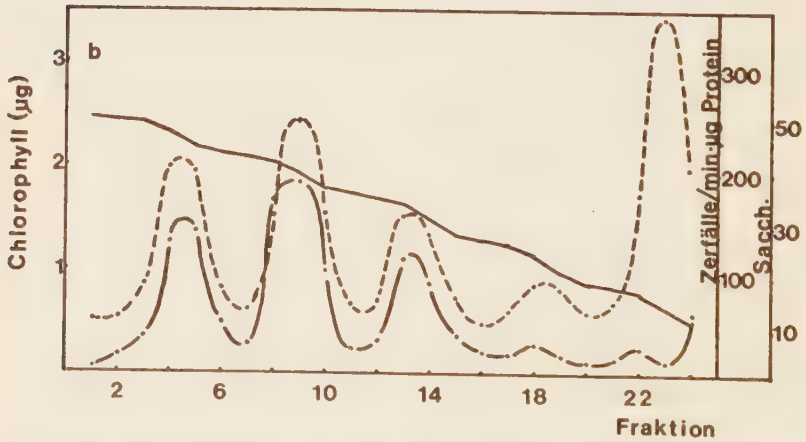
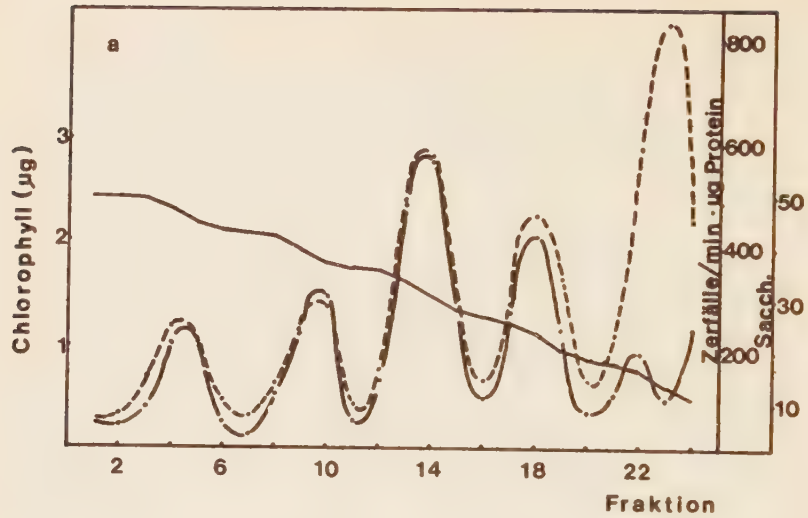


Abb. 4a, b: Auftrennung der Chloroplasten im Saccharosegradienten nach Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in das Protein in vivo;

a: Chloroplasten isoliert aus kernhaltigen Zellen

b: Chloroplasten isoliert aus Zellen 1 Woche nach der Entfernung des Kerns

Chlorophyll —

^{14}C -Markierung ----

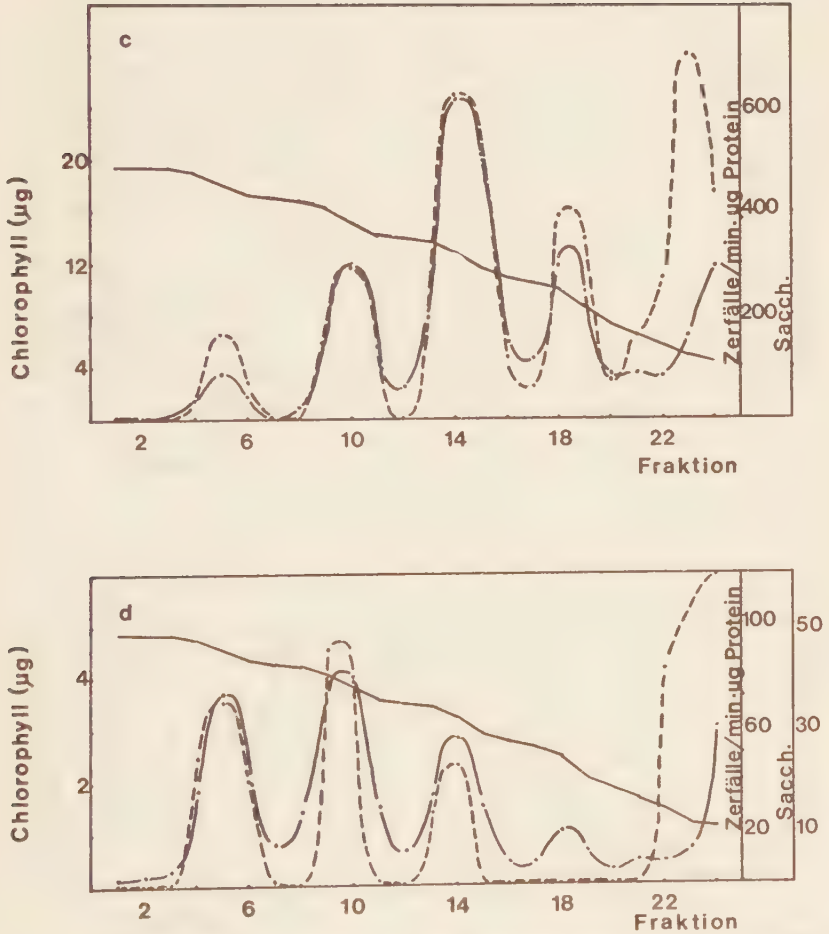


Abb. 4c, d: Auftrennung der Chloroplasten im Saccharosegradienten nach Einbau von ¹⁴C-Aminosäuren in das Protein in vivo:

c: Chloroplasten isoliert aus kernhaltigen Zellen

d: Chloroplasten isoliert aus Zellen 2 Wochen nach der Entfernung des Kerns

Chlorophyll —
¹⁴C-Markierung ----

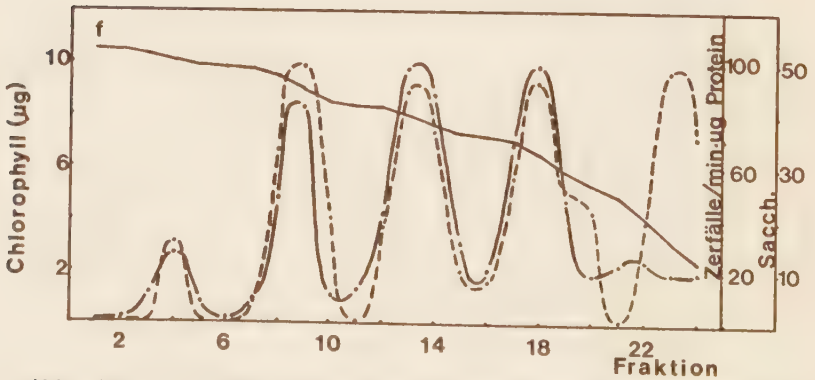
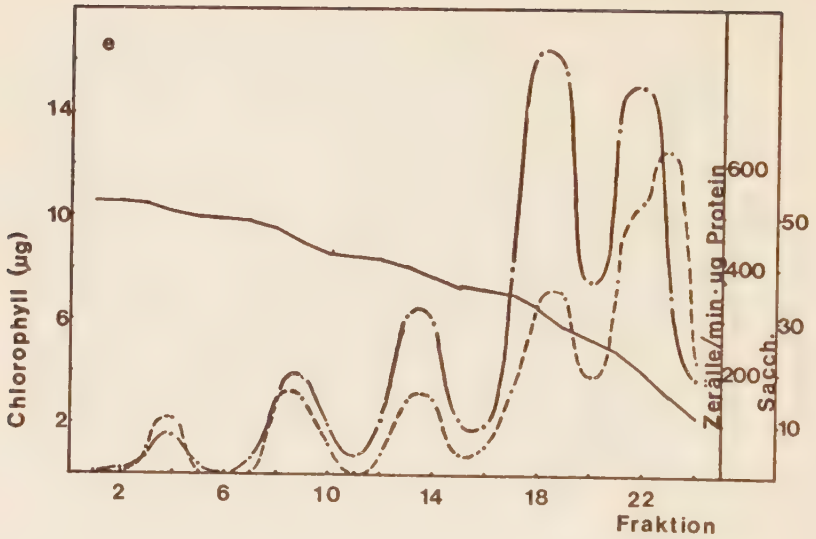


Abb. 4e, f: Auftrennung der Chloroplasten im Saccharosegradienten nach Einbau von ¹⁴C-Aminosäuren in das Protein in vivo;

e: Chloroplasten isoliert aus kernhaltigen Zellen

f: Chloroplasten isoliert aus Zellen 3 Wochen nach der Entfernung des Kerns

Chlorophyll —

¹⁴C-Markierung ----

Ungeklärt bleibt auch die sich anschließende Frage, ob in den Chlorophyllpeaks Chloroplasten mit unterschiedlicher Synthesekapazität angereichert sind. Bisher gibt es lediglich Hinweise, daß sich in den Chloroplastenbanden des Gradienten Chloroplasten unterschiedlicher Zusammensetzung akkumulieren. Das Verhältnis des Chlorophyllgehalts zum Stärkegehalt sei als Beispiel angeführt (Tab. 7).

Tabelle 7

Das Verhältnis von Stärke zu Chlorophyll in den Chloroplastenfraktionen des Saccharosegradienten und der Ausgangssuspension

Die Chloroplasten wurden von kernhaltigen und kernlosen Zellen (drei Wochen nach Kernentfernung) isoliert. Die Stärke wurde nach der Hydrolyse mit Amyloglukosidase als Glukose nach der Hexokinase-methode bestimmt. Tabelliert ist das Verhältnis von Stärke zu Chlorophyll in der Ausgangssuspension und den Chlorophyllmaxima der Gradienten mit den entsprechenden Saccharosekonzentrationen.

Zellen mit Kern		Zellen ohne Kern	
Sacch. (%)	Stärke Chloroph.	Sacch. (%)	Stärke Chloroph.
-x)	15.00	-x)	22.93
50.7	21.33	50.7	14.29
44.9	11.00	44.9	11.29
40.2	8.60	40.2	5.88
32.4	2.38	32.5	2.03
20.2	1.12	20.3	3.87

x) Ausgangssuspension

Der ansteigende Stärkegehalt in den Chlorophyllmaxima mit zunehmender Saccharosekonzentration konnte auch in weiteren Versuchen bestätigt werden, während umgekehrt ein abfallender Proteingradient festgestellt wurde (SCHAEEL und LÜTTKE unveröff.). Wieweit diese gegenläufigen Gradienten mit dem Chloroplastengradienten in der Zelle korrespondieren (PUISEUX-DAO und LEVIN 1970; HOURSANGOU-NEUBRUN und PUISEUX-DAO 1974), ist noch unklar. Versuche in dieser Richtung sind in Vorbereitung.

Die vorliegenden Meßdaten bestätigen nicht die Vermutung von PUISEUX-DAO (1970 a), daß "jüngere" Chloroplasten mit geringerem Stärkegehalt durch höhere Syntheseleistungen ausgezeichnet sind. Die Ergebnisse aufgrund des ^{14}C -Aminosäureeinbaus scheinen insofern auch den Angaben von ISSINGER et al. (1971) zu widersprechen. Diese Autoren konnten aufgrund von ^{14}C -Bicarbonateinbau feststellen, daß die Photosyntheserate in der Spitzenregion der Zelle am höchsten ist; sie ist am niedrigsten im Basalabschnitt, während die Mittelregion eine Zwischenstellung einnimmt. Wird hingegen die HILL-Reaktion als Parameter für die Photosyntheserate in den einzelnen Zellabschnitten gemessen, ergeben sich ebenfalls keine klaren Unterschiede (SCHMID unveröff.)

Die Werte für die spezifischen Aktivitäten der Ausgangssuspensionen geben nur einen groben Einblick in die Proteinsynthesekapazität der Chloroplasten, solange Ausmaß und - gravierender - die Einbauintensität der cytoplasmatischen Anteile unklar bleiben (WINKENBACH et al. 1972). Der letzte Aspekt scheint für die Beurteilung der außergewöhnlich hohen spezifischen Aktivität der Ausgangssuspension der kernhaltigen Zellen in der ersten Woche besonders wichtig.

Der Vergleich zwischen den spezifischen Aktivitäten des Chloroplastenproteins kernhaltiger und kernloser Zellen in den Gradientenfraktionen bestätigt jedoch erneut den geringeren Einbau bei den kernlosen Zellen. Bei den kernlosen Zellen ist zudem die Tendenz absinkender Proteinsyntheserate mit fortlaufender Dauer der Kernentfernung angedeutet (Tab. 6). Die Syntheserate des Chloroplastenproteins der kernhaltigen Zellen hingegen ist während der Versuchsdauer konstant. Der gleiche Schluß wurde bereits aufgrund der Entwicklung des Proteingehalts (CLAUSS 1958) und Pigmentgehalts (RICHTER 1958) der Chloroplasten kernhaltiger und kernloser Zellen vermutet.

3.2.3 Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in isolierte Chloroplasten und Auftrennung der Suspension im Saccharosedichtegradienten

Die Diskrepanz zwischen den spezifischen Aktivitäten des Chloroplastenproteins der Ausgangssuspensionen und der Gradientenfraktionen nach in "in vivo" Einbau warf die Frage auf, ob dieses Ergebnis auch nach "in vitro" Einbau festgestellt werden kann. Dies schien insofern interessant, da widersprüchliche Aussagen über den Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in das Protein isolierter Chloroplasten existieren. GOFFEAU und BRACHET (1965) stellten eine starke ^{14}C -Markierung des Proteins nach 30-minütiger Inkubation der Chloroplasten mit ^{14}C -Aminosäuren fest. APEL (1970), APEL und SCHWEIGER (1972) und APEL und SCHWEIGER (1973) zeigten, daß auch die Membranproteine markiert werden, wenngleich diese Einbauraten niedriger liegen als die von GOFFEAU und BRACHET. SNEPHARD und LEVIL (1972), die durch ^{14}C -Aminosäuren keine, jedoch durch $^{14}\text{CO}_2$ über Photosynthese eine Markierung des Chloroplastenproteins erreichten,

wiesen auf die Möglichkeit der Verunreinigung mit Cytoplasma bereits hin.

Auch in diesen Experimenten mit isolierten Chloroplasten wurde mit einem ^{14}C -Aminosäuregemisch inkubiert, da eine einzelne Aminosäure nicht in das Protein isolierter Chloroplasten eingebaut wird (APEL 1970).

Das Profil des Chlorophylls und der ^{14}C -Markierung im Gradienten (Abb. 5a, b) ist vergleichbar mit dem der vorangegangenen Versuche (vgl. Abb. 4). Übereinstimmend mit jenen ist auch hier die spezifische Aktivität der Ausgangssuspensionen höher als die der Gradientenfraktionen (Tab. 8). Einen deutlichen Unterschied zeigen jedoch die numerischen Werte, die erheblich niedriger liegen als bei den "in vivo" Einbauten (vgl. Tab. 6). Im ersten Versuch bildete sich bei der Gradientenzentrifugation der Chloroplastensuspension kernloser Zellen ein relativ starker Niederschlag, entsprechend schwach ausgebildet waren die Gradientenfraktionen, wie der Chlorophyllgehalt bereits anzeigte. Die Meßwerte der ^{14}C -Markierung lagen dann so niedrig, daß von einer weiteren Auswertung abgesehen wurde. Bei den Chloroplasten kernhaltiger Zellen war die spezifische Aktivität in der Ausgangssuspension viermal so hoch wie in dem höchsten Chlorophyllpeak. Bei der Wiederholung des Versuchs ergaben sich vergleichbare Werte sowohl für die Chloroplasten aus kernhaltigen Zellen wie auch aus kernlosen Zellen (Tab. 8).

Wie bei der Messung nach der Inkubation "in vivo" war die spezifische Aktivität in den leichtesten Fraktionen vergleichsweise hoch. Bei den Chloroplasten aus kernhaltigen Zellen betrug die spezifische Aktivität in Fraktion 17 25 dpm/ μg Protein, bei den Chloroplasten

aus den kernlosen Zellen in der entsprechenden Fraktion 44 dpm/ μg Protein (s. Abb. 5a,b).

Im Gegensatz zu den "in vivo" Einbauten besteht jedoch kein Unterschied in der Einbaurrate der Chloroplasten kernhaltiger und kernloser Zellen, wenn die Gradientenfraktionen verglichen werden (Tab. 8).

Tabelle 8

Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in das Protein isolierter Chloroplasten

Die Chloroplasten wurden aus kernhaltigen und kernlosen Zellen isoliert (Versuch 1 zwei Wochen nach Kernentfernung, Versuch 2 drei Wochen nach Kernentfernung). 3 ml Chloroplastensuspension wurden 1.5 Stunden mit einem ^{14}C -Aminosäuregemisch inkubiert (10 $\mu\text{Ci/ml}$; uniform markiert); die Suspension wurde anschließend von unspezifisch gebundenen, markierten Aminosäuren gereinigt und im diskontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt. Tabelliert sind die spezifischen Aktivitäten (Zerfälle $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$) des Proteins der Ausgangssuspensionen und der Gradientenfraktionen mit dem höchsten Chlorophyllgehalt.

Spezifische Aktivität (Zerfälle $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$)				
Versuch	Zellen mit Kern		Zellen ohne Kern	
	Ausgangs- suspens.	Gradienten- fraktion	Ausgangs- suspens.	Gradienten- fraktion
1	12	3	14	-
2	15	3	12	3

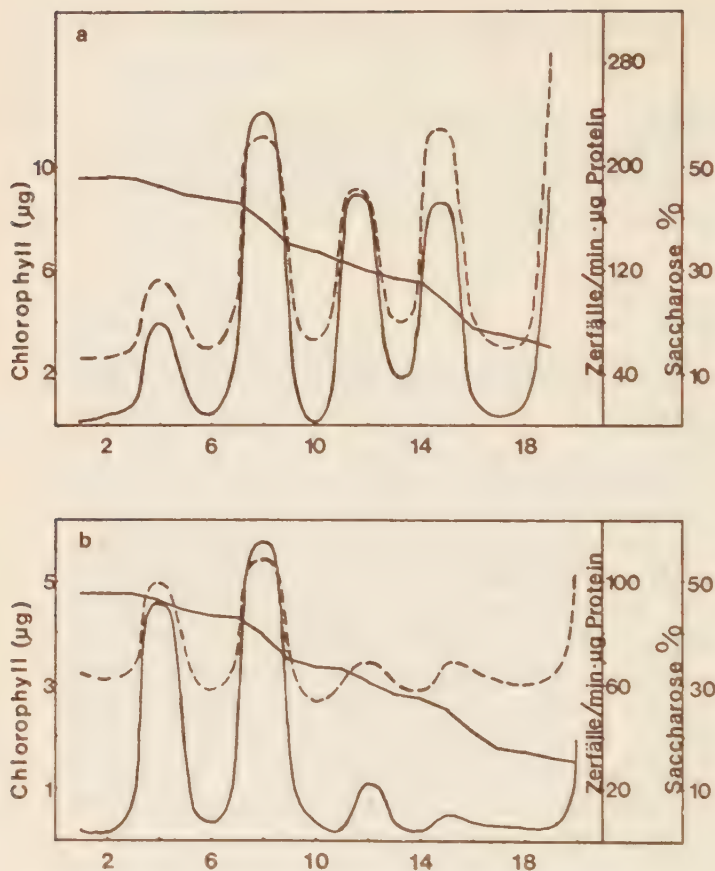


Abb. 5a, b: Auftrennung der Chloroplasten im diskontinuierlichen Saccharosegradienten nach Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in das Protein in vitro; die Chloroplasten wurden aus Zellen 3 Wochen nach Entfernung des Kerns isoliert.

Chlorophyll — a) Zellen mit Kern
 ^{14}C -Markierung ---- b) Zellen ohne Kern

3.2.4 Die Einbaukinetik von ^{14}C -Leucin in das Gesamtprotein und Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen

Die folgenden Versuche dienten dem Vergleich der Einbaukinetik von ^{14}C -Leucin in das Protein ganzer Zellen und ihrer Chloroplasten, sowie dem Vergleich der Einbaukinetik in das Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen.

Abb. 6a, b zeigt wiederum deutlich den starken Einbau in "nicht-Chloroplastenprotein" sowohl bei kernhaltigen wie bei kernlosen Zellen. Wie auch APEL (1970) für die unlösliche Proteinfraction der Chloroplasten feststellte, ist der Einbau der Aminosäure sowohl in das Gesamtprotein wie auch Chloroplastenprotein nach ca. drei Stunden beendet. Widersprüchlich zu den bisher dargestellten Ergebnissen (s. Tab. 5) scheint die höhere spezifische Aktivität des Homogenats kernloser Zellen. Die ^{14}C -Konzentration im Medium bei diesem Versuch dürfte der limitierende Faktor sein. Es muß berücksichtigt werden, daß bei gleicher ^{14}C -Konzentration im Medium annähernd die gleiche Menge aufgenommen wurde (Abb. 7), der Proteingehalt der kernhaltigen Zellen jedoch doppelt so hoch war.

Die spezifische Aktivität des Chloroplastenproteins kernhaltiger Zellen ist jedoch, wie auch in einem weiteren Versuch (Abb. 8), höher als die kernloser Zellen und zeigt außerdem nach der Sättigungsphase einen zweiten Anstieg. Der Einbau in die Chloroplasten kernhaltiger Zellen scheint, anders als bei den kernlosen Zellen, durch eine "zwei-Phasenkinetik" gekennzeichnet zu sein.

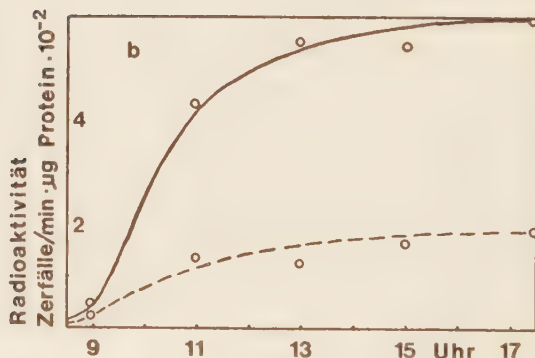
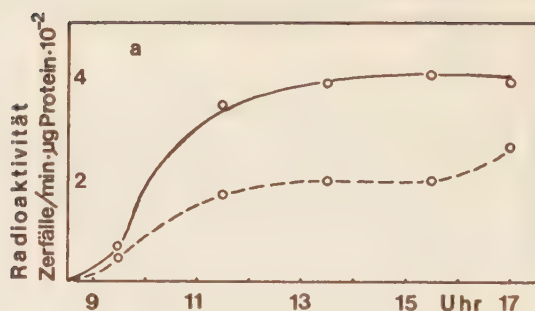


Abb. 6a, b: Einbau von ^{14}C -Leucin in das Gesamtprotein und Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen; es wurden je 100 Zellen in 20 ml Seewasser mit 2.27 µCi ^{14}C -Leucin (spez. Akt. 280 mCi/mM) inkubiert; angegeben sind die Mittelwerte von 2 Parallelansätzen.

a Zellen mit Kern

b Zellen ohne Kern

Zellhomogenat —

Chloroplasten ----

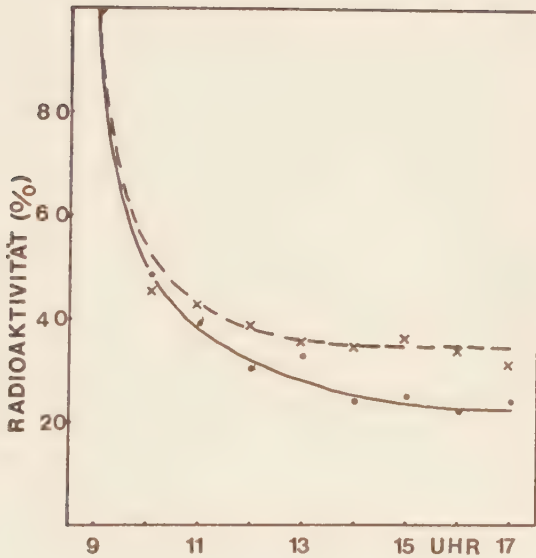


Abb. 7: Abnahme der Radioaktivität im Medium während der Inkubation kernhaltiger und kernloser Zellen; es wurden je 100 Zellen in 20 ml Seewasser mit 2.27 μCi ^{14}C -Leucin (spez. Akt. 280 mCi/mM) inkubiert; angegeben sind die Mittelwerte von 2 Parallelansätzen.

Zellen mit Kern —

Zellen ohne Kern ----

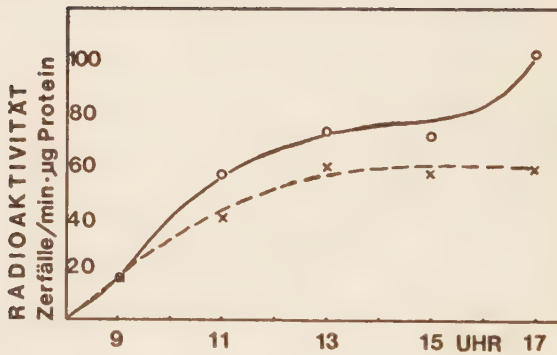


Abb. 8: Einbau von ^{14}C -Leucin in das Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen während der Inkubation in vivo; es wurden je 180 Zellen in 20 ml Seewasser mit $2.27 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Leucin (spez. Akt. 280 mCi/mM) inkubiert; angegeben sind die Mittelwerte von 2 Parallelansätzen.

Zellen mit Kern —

Zellen ohne Kern ----

Bei Langzeiteinbau muß immer überlegt werden, ob die Tagesperiodik der Photosynthese oder andere rhythmisch ablaufende Stoffwechselprozesse den Versuchsablauf beeinträchtigen können. Nach den Angaben von RICHTER (1963) und dem dargestellten Verlauf des Einbaus könnte die Tagesperiodik der Photosynthese mittelbar die Proteinsynthese in den Chloroplasten beeinflussen; verstärkte Proteinsynthese wäre dem Maximum der Photosynthese gleichsam nachgeschaltet. Da jedoch auch bei kernlosen Zellen diese Tagesperiodik - wenn auch weniger ausgeprägt - festgestellt wurde, sollte sich ein ähnlicher Kurvenverlauf wie bei kernhaltigen Zellen ergeben.

Bei kernhaltigen Zellen könnte andererseits nach der Sättigungsphase ein zweiter Einbauschub in das Chloroplastenprotein durch Umbauprodukte der gefütterten Aminosäuren induziert worden sein. Bei kernlosen Zellen hingegen, deren Gehalt an löslichen Stickstoffverbindungen höher ist (BRACHET et al. 1955), ist eine Akkumulation der gefütterten Aminosäure oder ihrer Umbauprodukte im Cytoplasma naheliegend (BREMER et al. 1962). Eine weitere Möglichkeit für den andersartigen Verlauf der Kinetik bei den kernhaltigen Zellen ergibt sich aus der diurnalen rhythmischen Chloroplastenvermehrung (PUISEUX-DAO 1970 b). Gegen 17 Uhr überwiegt der Anteil kleiner Chloroplasten mit einer Plastideneinheit; gerade diese Plastiden sind durch aktiven Stoffwechsel ausgezeichnet.

3.3 Bestimmung der Turnoverzeit des Proteins ganzer Zellen und ihrer Chloroplasten

3.3.1 Modellvorstellung zur Bestimmung der Turnoverzeit

Mit Hilfe der Doppelmarkierungsmethode wurde der relative Turnover des Chloroplastenproteins kernhaltiger und kernloser Zellen bestimmt. Im Prinzip basiert dieser Versuchsansatz auf der sukzedanen Messung der Radioaktivität im Chloroplastenprotein nach Pulsmarkierung. Nach gleichem Prinzip erfolgte auch die Bestimmung in den folgenden Versuchen; einige grundlegende Überlegungen sollen zunächst vorausgeschickt werden.

Das für den Versuchsansatz gewählte System orientiert sich an den Ausführungen von ARONOFF (1956), die auf SOLOMON (1949) zurückgehen. ARONOFF charakterisiert die Turnoverzeit, d. h. die Zeit, in welcher die Substanzmenge eines Poolinhalts umgesetzt wird (PAYER 1969), mit der Gleichung:

$$t_T = \frac{M}{k}$$

t_T = Turnoverzeit

k = Durchflußrate

M = Konzentration der
zu bestimmenden
Substanz

Die Durchflußrate k kann am einfachsten dadurch bestimmt werden, daß die Abnahme der Markierung über einige Zeit verfolgt wird, nachdem sich das System im "steady state" befindet.

Aus der entsprechenden Differentialgleichung

$$\frac{d M^x}{dt} = \frac{-k M^x}{M}$$

läßt sich nach Integration

$$M^x = M_0^x e^{-kt/M}$$

und Transformation in den dekadischen Logarithmus

$$\log \frac{M^x}{M_0^x} = \frac{kt}{2.3 M}$$

die Durchflußrate k bestimmen.

Der logarithmische Auftrag der Radioaktivität gegen die Zeit ergibt eine Gerade mit der Steigung k/M , die der Abbaurrate pro Substanzkonzentration und Zeiteinheit entspricht (Beispiel: $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{Tag}$). Mit diesem Wert läßt sich dann die Turnoverzeit (Tag) bestimmen, d. h. die durchschnittliche Lebensdauer der Moleküle.

Um dieses Konzept jedoch direkt zu übernehmen, wäre die Kenntnis der absoluten Konzentration des Chloroplastenproteins für jeden Meßpunkt notwendig. Quantitative Isolierung der Chloroplasten aus den Zellen und gleichzeitig Reinigung der Suspension von cytoplasmatischen Verunreinigungen sind jedoch unvereinbar. Zwei Möglichkeiten standen zur Wahl diese methodisch nicht realisierbaren Anforderungen zu umgehen:

(1) Bestimmung des Proteingehalts der Chloroplasten pro Zelle indirekt über den Chlorophyllgehalt. Aus dem Verhältnis von Chlorophyll zu Protein der Chloroplastensuspension kann auf den Gesamtproteinanteil der Chloro-

plasten pro Zelle geschlossen werden, wenn der Chlorophyllgehalt pro Zelle bekannt ist.

(2) Bestimmung der spezifischen Aktivität (Zerfälle $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$) des Chloroplastenproteins und weitere Berechnung der Turnoverzeit mit dem logarithmierten Wert für die spezifische Aktivität. Die Durchflußrate k gibt bei dieser Berechnung die Proteinmenge an, die bezogen auf $1 \mu\text{g Protein pro Tag}$ umgesetzt wird.

Da die zweite Methode zuverlässiger erschien, wurde die Turnoverzeit bei den folgenden Versuchen stets über die spezifische Aktivität des Chloroplastenproteins ermittelt; die Meßwerte bildeten jedoch aus folgenden Gründen nicht die direkte Grundlage für die Berechnung:

(1) Das System setzt voraus, daß sich die Gesamtkonzentration der zu untersuchenden Substanz nicht wesentlich ändert. Da bei kernhaltigen und in geringerem Maß auch bei kernlosen Zellen Proteinnettosynthese stattfindet, sollte der Abstand zwischen den Meßpunkten so kurz wie möglich sein, um die Nettosynthese vernachlässigen zu können. Die Messung in rasch aufeinanderfolgenden Abständen (≤ 1 Tag) setzt andererseits einen relativ hohen Turnover mit entsprechend starker Änderung der Markierung innerhalb kurzer Zeit voraus. Das folgende Beispiel zeigt jedoch, daß die Meßwerte für die Radioaktivität und die daraus berechnete spezifische Aktivität für das Chloroplastenprotein im Abstand von 24 Stunden nur sehr geringe Unterschiede zeigen:

Für das Chloroplastenprotein aus kernhaltigen Zellen wurden nach der ersten Chloroplastenisolierung im aliquot der Suspension 5781 cpm gemessen, nach der zweiten Isolierung 24 Stunden später 5764 cpm; bei dem Chloroplastenprotein aus kernlosen Zellen ergaben die ent-

sprechenden Meßwerte 3646 cpm bzw. 3318 cpm. Die Werte der zugehörigen spezifischen Aktivitäten lagen für die kernhaltigen Zellen bei 53 und 49 Zerfälle $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$, die für die kernlosen Zellen bei 73 und 61 Zerfälle $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$.

Es muß außerdem berücksichtigt werden, daß in den Ausdruck "spezifische Aktivität" zwei unabhängige Meßgrößen eingehen - die Radioaktivität und der Proteingehalt -, die beide mit einem spezifischen Fehler belegt sind.

(2) Die graphische Darstellung der Abnahme der Radioaktivität zeigt nicht die lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der spezifischen Aktivität und der Zeit (Abb. 9, 10, 11). Bei kernlosen Zellen wurde sogar häufig ein Wiederanstieg der spezifischen Aktivität beobachtet, teilweise auch bei kernhaltigen Zellen. Die Ursachen für diesen Kurvenverlauf dürften in der Proteinnettosynthese bei kernhaltigen Zellen und im Wiedereinbau markierter Abbauprodukte bei kernhaltigen und kernlosen Zellen (BIDWELL et al. 1964; POOLE et al. 1969; ZIELKE und FILNER 1971) liegen.

(3) Die Meßpunkte streuten relativ stark. Der Hauptgrund dürfte in den Chloroplastenpräparationen selbst liegen, die trotz Konstanzhaltung aller Isolierungsschritte unterschiedlich ausfallen. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel dargestellt (s. Auftrennung der Chloroplastensuspension im Saccharosedichtegradienten), werden die Meßwerte in besonderem Maß durch cytoplasmatische Verunreinigung beeinträchtigt.

Die dargelegten Gründe führten zu folgendem Vorgehen bei der Auswertung der Meßwerte: durch die logarithmierten Werte für die spezifische Aktivität wurde eine

Ausgleichskurve gezogen, aus der graphischen Darstellung die Werte für Tag 1 und 2 der Untersuchungsperiode abgelesen und der Berechnung zugrundegelegt (s.a. RACUSEN und FOOTE 1960). Dieser Auswertungsmodus führte zwar zu leicht abweichenden numerischen Werten für die Turnoverzeit (ca. 1 Tag), als wenn die Meßwerte selbst Basis für die Berechnung wären. Unterschiede, die sich teilweise zwischen kernhaltigen und kernlosen Zellen ergaben, blieben jedoch erhalten.

3.3.2 Bestimmung der Turnoverzeit nach ^{14}C -Leucinmarkierung

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die berechneten Turnoverzeiten aus vier verschiedenen Versuchen; in Abbildung 9a-d sind die entsprechenden Kurven dargestellt.

Im Versuch 1 und 2 wurde überprüft, ob der Zeitpunkt der Kernentfernung vor Versuchsbeginn auf die Turnoverzeit des Chloroplastenproteins Einfluß nimmt. Für das Chloroplastenprotein aus kernlosen Zellen wurde eine übereinstimmende Turnoverzeit von ca. 12 Tagen berechnet, obwohl die Versuche 2 bzw. 14 Tage nach der Kernentfernung begonnen wurden. Für das Chloroplastenprotein kernhaltiger Zellen ergab sich demgegenüber die etwas kürzere Turnoverzeit von 9 Tagen.

Tabelle 9

Abnahme der ^{14}C -Markierung im Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen nach ^{14}C -Leucineinbau

Genaue Angaben über die ^{14}C -Leucinkonzentration im Medium, Dauer der Inkubation und Zeitpunkt der Kernentfernung sind für die einzelnen Versuche einzeln aufgeführt.

Tabelliert ist der Logarithmus der spezifischen Aktivität (Zufälle $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$), berechnet aus den Meßwerten und ermittelt aus den graphischen Werten, die Durchflußkonstante k und die aus den graphisch ermittelten Werten berechnete Turnoverzeit t_T . Der Zeitpunkt der ersten Chloroplastenisolierung wird als Tag 1 bezeichnet.

Zellen mit Kern					Zellen ohne Kern				
Versuch 1: 2d kernlos bei Inkubationsbeginn; 8 h Einbau; 1. Chloroplastenisolierung 20 h später; 350 Zellen/50 ml Seewasser; 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$									
Tag	log. spez. Akt.	x) log. spez. Akt.	k	$t_T(\text{d})$	Tag	log. spez. Akt.	x) log. spez. Akt.	k	$t_T(\text{d})$
1	2.7101	2.7101	0.1106	9.04	1	2.4983	2.4983	0.0858	11.66
5	2.5441	2.662			5	2.3284	2.461		
8	2.4771				8	2.3222			
12	2.4425				12	2.2330			
14	2.2742				14	2.1106			
Versuch 2: 14d kernlos bei Inkubationsbeginn; 6 h Einbau; 1. Chloroplastenisolierung 24 h später; 400 Zellen/50 ml Seewasser; 0.4 $\mu\text{Ci/ml}$									
1	2.887	2.488	0.1104	9.06	1	2.3345	2.3345	0.0817	12.3
3	2.4031	2.440			3	2.2279	2.299		
7	2.2833				7	2.1038			
10	2.2227				10	2.0719			
14	2.1399				14	2.2577			

x) graphisch ermittelte Werte

Fortsetzung Tabelle 9

Zellen mit Kern					Zellen ohne Kern				
Versuch 3: 9d kernlos bei Inkubationsbeginn; 24 h Einbau; 1. Chloroplastenisolierung 20 h später; 600 Zellen/50 ml Seewasser; 0.043 $\mu\text{Ci/ml}$									
Tag	log. spez. Akt.	x) log. spez. Akt.	k	$t_T(\text{d})$	Tag	log. spez. Akt.	x) log. spez. Akt.	k	$t_T(\text{d})$
1	1.9243	1.9243	0.4239	2.36	1	1.8865	1.8865	0.2841	3.52
4	1.5185	1.740			4	1.5911	1.763		
8	1.3424				8	1.4314			
11	1.3010				11	1.1139			
Versuch 4: 11d kernlos bei Inkubationsbeginn; 16 h Einbau; 1. Chloroplastenisolierung 6 h später; 500 Zellen/25 ml Seewasser; 0.8 $\mu\text{Ci/ml}$									
1	2.5911	-	-	- xx)	1	2.6590	2.6590	0.2024	4.94
3	2.5877				3	2.4997	2.571		
7	2.4487				7	2.3222			
11	2.3747				11	2.3784			
14	2.4829				14	2.4265			
17	2.4871				17	2.3802			

xx) Die Differenz zwischen den Meßwerten ist so gering, daß noch kein Turnover bestimmt werden kann. Wird der Abstand zwischen der 2. und 3. Chloroplastenisolierung für die Berechnung zugrundegelegt, ergibt sich für das Chloroplastenprotein aus kernhaltigen Zellen eine Turnoverzeit von 12.5 d, für das aus kernlosen Zellen von 9.8 d.

x) graphisch ermittelte Werte

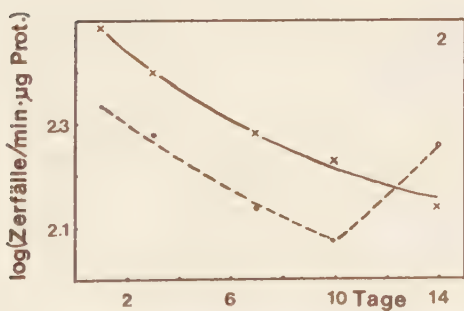
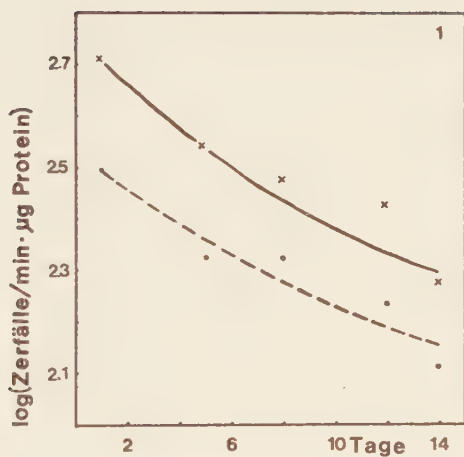


Abb. 9a, b: Abnahme der Radioaktivität im Chloroplastenprotein nach Inkubation der Zellen mit ^{14}C -Leucin; genaue Angaben s. Tab. 9

Zellen mit Kern —

Zellen ohne Kern ----

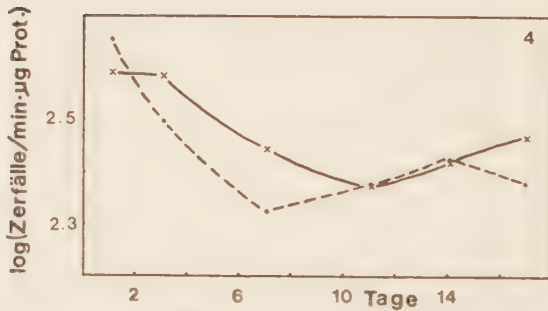
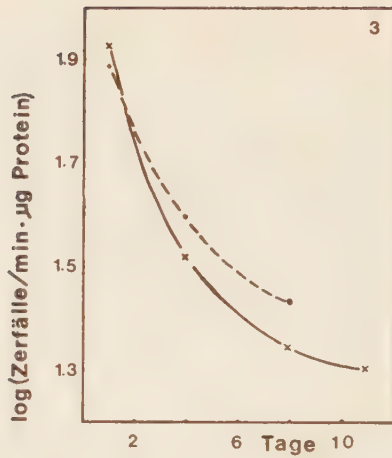


Abb. 9c, d: Abnahme der Radioaktivität im Chloroplastenprotein nach Inkubation der Zellen mit ^{14}C -Leucin; genaue Angaben s. Tab. 9

Zellen mit Kern —

Zellen ohne Kern ----

In den folgenden beiden Versuchen wurde getestet, ob der Turnover durch die Zeit, die zwischen dem Inkubationsende und erster Chloroplastenisolierung liegt, beeinträchtigt wird. Die Versuche zur Bestimmung des relativen Turnover (s. Ergebnisse 3.1.3) legen nahe, daß Chloroplasten in kernlosen Zellen durch einen höheren Turnover ausgezeichnet sind. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses und des nicht-linearen Kurvenverlaufs der vorliegenden Versuche ist es fraglich, ob die Isolierung der Chloroplasten bei kernhaltigen und kernlosen Zellen zum gleichen Zeitpunkt vorgenommen werden kann. Da nur die Anfangsneigung als Berechnungsgrundlage diente, müßte bei kernlosen Zellen aufgrund der bisherigen Daten früher mit der Chloroplastenisolierung begonnen werden.

Die Ergebnisse des 3. und 4. Versuchs weichen in zwei Punkten deutlich von den ersten beiden ab.

(1) Die Turnoverzeit für die Chloroplasten kernhaltiger und kernloser Zellen ist kürzer, wenn die Zellen nach der Inkubation längere Zeit in ^{12}C -Leucin-haltigem Medium verbleiben (Versuch 3). Dieses Ergebnis ist allerdings überraschend; die Kurven verlaufen steiler als in den anderen Versuchen, obgleich erst drei Tage nach Ende der Inkubation die erste Chloroplastenisolierung vorgenommen wurde. Aus den vorherigen Versuchen mußte indes erwartet werden, daß die Kurve umso flacher verläuft, je größer der Abstand zwischen dem Ende der Inkubation und der ersten Chloroplastenisolierung ist. Erschwert wird die Interpretation des abweichenden Kurvenverlaufs zudem durch die geringe ^{14}C -Leucinkonzentration im Medium (die Werte für die spezifische Aktivität des Chloroplastenproteins sind deutlich niedriger als in den anderen Versuchen). Andererseits sollte die Ausgangskonzentration gerade dann, wenn die Zellen

längere Zeit in kaltem Medium gehalten werden, keine Rolle spielen. Es darf dann angenommen werden, daß sich das System im Gleichgewicht befindet.

(2) Die Turnoverzeit der Chloroplasten kernloser Zellen ist bereits meßbar, wenn die Chloroplastenisolierung relativ kurz nach Inkubationsende vorgenommen wird; bei den Chloroplasten aus kernhaltigen Zellen ist zum gleichen Zeitpunkt hingegen kein Turnover zu messen. Werden die späteren Meßpunkte zur Berechnung herangezogen, liegt die Turnoverzeit für das Chloroplastenprotein kernloser Zellen nur noch geringfügig unter derjenigen kernhaltiger Zellen. Aufgrund des nicht-linearen Kurvenverlaufs gibt bei den kernlosen Zellen dieser Wert gegenüber dem ersten einen längeren Turnover an.

In den ersten beiden Versuchen wurde zusätzlich der Turnover des Gesamtproteins aus dem Zellhomogenat gemessen (Tab. 10, Abb. 10a, b). Der Turnover des Gesamtproteins ist in beiden Experimenten höher als der des Chloroplastenproteins, er unterscheidet sich aber nicht bei kernhaltigen und kernlosen Zellen.

Tabelle 10

Abnahme der ^{14}C -Markierung im Protein kernhaltiger
und kernloser Zellen

Die Messungen für die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Proteins ($\text{Zerfälle} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g Protein}^{-1}$) kernhaltiger und kernloser Zellen wurden mit einem aliquot des Zellhomogenats durchgeführt; alle weiteren Angaben s. Legende zu Tabelle 9.

Zellen mit Kern					Zellen ohne Kern				
Versuch 1: 2 d kernlos bei Inkubationsbeginn; 8 h Einbau; 1. Homogenat 20 h später; 350 Zellen/50 ml Seewasser; 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$									
Tag	log. spez. Akt.	x) log. spez. Akt.	k	$t_T(\text{d})$	Tag	log. spez. Akt.	x) log. spez. Akt.	k	$t_T(\text{d})$
1	2.9862	2.9862	0.1546	6.5	1	2.8270	2.870	0.1541	6.5
5	2.7767	2.919			5	2.5960	2.760		
8	2.6219				8	2.3855			
12	2.5919				12	2.2958			
14	2.5415				14	2.1699			
Versuch 2: 14 d kernlos bei Inkubationsbeginn; 6 h Einbau; 1. Homogenat 24 h später; 400 Zellen/50 ml Seewasser; 0.4 $\mu\text{Ci/ml}$									
1	2.7612	2.7612	0.2558	3.9	1	2.7589	2.7589	0.2505	4.0
3	2.5798	2.650			3	2.5070	2.650		
7	2.3874				7	2.4362			
10	2.2945				10	2.2380			
14	2.1931				14	2.2601			

x) graphisch ermittelte Werte

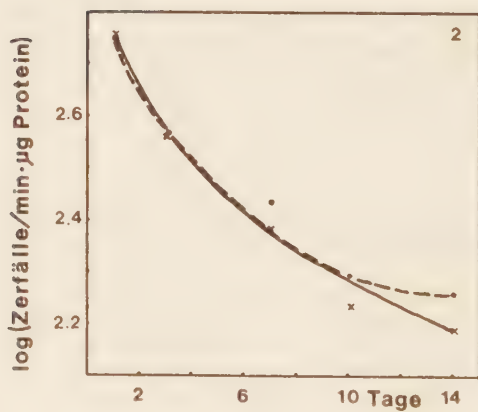
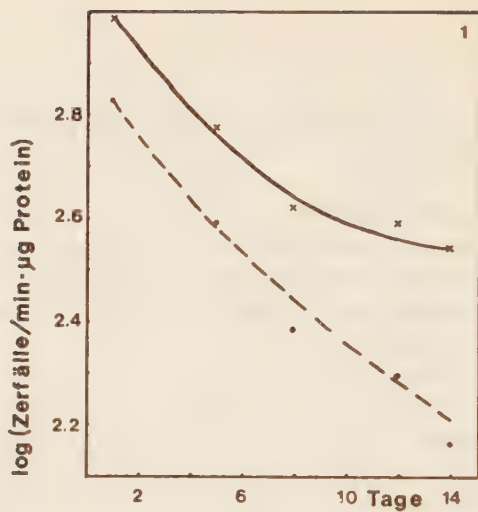


Abb. 10 a, b: Abnahme der Radioaktivität im Gesamtprotein nach Inkubation der Zellen mit ^{14}C -Leucin; genaue Angaben s. Tab. 10.

Zellen mit Kern —

Zellen ohne Kern ----

3.3.3 Bestimmung der Turnoverzeit nach ^{14}C -Bicarbonatmarkierung

Für verschiedene Objekte ist der Nachweis erbracht, daß nach $^{14}\text{CO}_2$ -Photosynthese nicht nur die Metaboliten des Calvinzyklus markiert sind. Spinatchloroplasten, die aus den Blättern nach $^{14}\text{CO}_2$ -Fütterung isoliert wurden, bauen mit Beginn der Photosynthese Radioaktivität in das Chloroplastenprotein ein (HEBER 1962). Bei Chlorella pyrenoidosa konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Markierung freier und gebundener Aminosäuren festgestellt werden (BASSHAM et al. 1964). Auch in Chloroplasten von Acetabularia läßt sich Proteinmarkierung nachweisen, wenn die Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre stattfindet (SHEPHARD und LEVIN 1972).

Bei den folgenden Versuchen wurden die Zellen drei Tage mit ^{14}C -Bicarbonat inkubiert und anschließend vor der Chloroplastenisolierung weitere vier Tage in kaltem Medium kultiviert. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte in der bereits beschriebenen Weise aufgrund der graphischen Darstellung (Abb. 11a, b).

Die Werte für das Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen weichen im ersten Versuch nur unwesentlich voneinander ab, im zweiten Versuch zeigen sie gute Übereinstimmung (Tab. 11). Obgleich die Turnoverzeit des Chloroplastenproteins kernloser Zellen zwei und zwölf Tage nach der Entfernung des Kerns unterschiedlich ist, scheint der Zeitpunkt der Kernentfernung nicht der ausschlaggebende Faktor zu sein. Auch für das Chloroplastenprotein der kernhaltigen Zellen wurde im zweiten Versuch ein längerer Turnover gemessen, identisch mit dem der kernlosen Zellen. Aufgrund der übereinstimmenden Werte kernhaltiger und kernloser Zellen ist zu vermuten, daß die Differenz zwischen den Turnoverzeiten auf das unterschiedliche Entwicklungsstadium der Zellen zurückzuführen ist.

Tabelle 11

Abnahme der ^{14}C -Markierung im Chloroplastenprotein
kernhaltiger und kernloser Zellen nach ^{14}C -Bicarbonat-
einbau

Angaben siehe Legende zu Tabelle 9

Zellen mit Kern					Zellen ohne Kern				
Versuch 1: 3 d kernlos bei Inkubationsbeginn; 3 d Einbau; 1. Chloroplastenisolierung 4 d später; 600 Zellen/200 ml Seewasser; 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$									
Tag	x)		k	$t_T(\text{d})$	Tag	x)		k	$t_T(\text{d})$
	log. spez. Akt.	log. spez. Akt.				log. spez. Akt.	log. spez. Akt.		
1	3.4739	3.4739	0.0941	10.63	1	3.3010	3.3010	0.0798	13.18
5	3.3282	3.433			5	3.1700	3.268		
11	3.1838				11	3.0306			
14	3.1813				14	3.1629			
Versuch 2: 12 d kernlos bei Inkubationsbeginn; 3 d Einbau; 1. Chloroplastenisolierung 4d später; 600 bzw. 700 Zellen/ 25 ml Seewasser; 4 $\mu\text{Ci/ml}$									
1	3.2772	3.2772	0.0626	15.97	1	3.1578	3.1578	0.0639	15.65
4	3.1978	3.250			4	3.0708	3.130		
8	3.1361				8	3.0734			
12	3.1632				12	3.0959			

x) graphisch ermittelte Werte

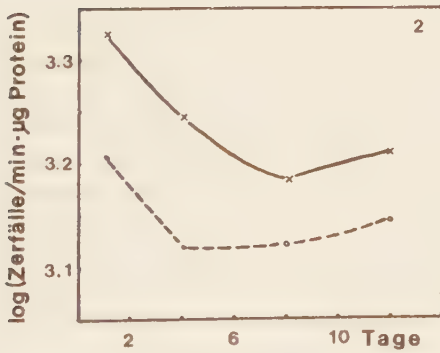
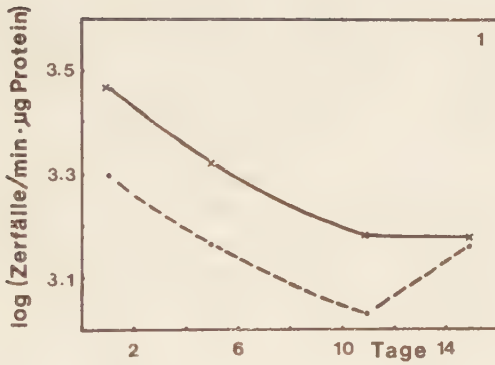


Abb. 11a, b: Abnahme der Radioaktivität im Chloroplastenprotein nach Inkubation der Zellen mit ^{14}C -Bicarbonat; genaue Angaben s. Tab. 11.

Zellen mit Kern —
Zellen ohne Kern ----

4. DISKUSSION

Abfallende Intensität der Proteinsyntheserate ist in kernlosen Zellen und ihren Organellen verschiedentlich festgestellt worden (CLAUSS 1958; CLAUSS und WERZ 1961). Ebenso läßt die CO_2 -Fixierung, bezogen auf den Proteingehalt, kernloser Teile zwei Wochen nach der Entfernung des Kerns kontinuierlich nach (BRACHET et al. 1955) oder zeigt zumindest keinen weiteren Anstieg, nachdem das Längenwachstum beendet war (ZETSCHKE et al. 1972). Die gleiche Beobachtung konnte auch in bezug auf den ^{14}C -Leucineinbau in das Chloroplastenprotein kernloser Zellen gemacht werden (Tab. 6).

Trotz reduzierter Syntheserate und/oder fehlender Nettosynthese sind die kernlosen Zellen zu morphogenetischen Leistungen imstande; die Wirtel- und Hutbildung geben einen deutlichen Hinweis (BRÄNDLE 1974; vgl. aber CLAUSS 1958). Der Entwicklungsabschnitt während der Hutbildung ist nicht nur durch eine Änderung der Wachstumsrichtung - Neuorientierung der Mikrofibrillen in der Zellwand (WERZ und STREITBÜRGER 1973) - charakterisiert. Auch die Zusammensetzung der Hutwand unterscheidet sich qualitativ und quantitativ von der des Stiels (ZETSCHKE 1967; WERZ 1963). Zumindest in Bezug auf diese Syntheseleistung muß das Enzymmuster der Zelle den veränderten Anforderungen angepaßt werden (ZETSCHKE 1965). Tatsächlich konnte in kernlosen Zellen für das Enzym UDPG-Pyrophosphorylase, das in engem Zusammenhang mit der Hutbildung steht, auch dann noch eine Aktivitätszunahme festgestellt werden, wenn der Proteingehalt nahezu konstant blieb (ZETSCHKE 1968; ZETSCHKE et al. 1970).

Bei fehlender Nettosynthese scheint die Einstellung des Enzymmusters auf das entsprechende Entwicklungs-

stadium jedoch nur dann möglich, wenn gleichzeitig Abbauprozesse stattfinden. Diese Überlegung setzt allerdings voraus, daß die Veränderung des Enzymspektrums mit Enzymneusynthese verbunden ist, wie sie für die UDPG-Pyrophosphorylase wahrscheinlich gemacht wurde (ZETSCHKE 1968), und nicht lediglich Aktivierung bereits vorhandener Enzymmoleküle bedeutet.

Ebenso kann bei stornierter Proteinnettosynthese der ^{14}C -Leucineinbau in kernlosen Zellen - wenn auch reduziert gegenüber kernhaltigen Kontrollzellen - nur unter der Annahme gleichzeitig stattfindender Proteindegradation verstanden werden. Proteinturnover, womit Synthese und Abbau als parallel ablaufende Prozesse gemeint sind, ist demnach keineswegs auf wachsende Organismen beschränkt. Er scheint vielmehr gerade im nichtwachsenden System grundlegende Regulationsfunktion auszuüben.

Verschiedene Auffassungen, seltener klare Definitionen für den Begriff "Turnover" werden vertreten; hier sei der Umschreibung von HUFFAKER und PETERSON (1974) gefolgt: "we shall define turnover as the flux of amino acid through protein."

Der Proteinturnover gibt der Zelle die einzigartige Möglichkeit zur Umsteuerung des Stoffwechsels als Reaktion auf endogene und exogene Faktoren (SIEKEVITZ 1972; HUFFAKER und PETERSON 1974). Abhängig von dem Auslöser mag die physiologische Reaktion verschieden sein: sie kann das Proteinmuster oder die Enzymaktivitäten des ganzen Organismus oder nur spezifische Organellen betreffen. Gerade wenn keine Nettosynthese beobachtet wird, ist der Turnover die einzige Möglichkeit zur Anpassung des Organismus an veränderte Umweltbedingungen (MANDELSTAM 1960). Diese Annahme konnte für Bakterien-

kulturen (MANDELSTAM 1960; PINE 1966) und Gewebekulturen aus Karotten (BIDWELL et al. 1964) bestätigt werden. Sie ist auch zutreffend für die kernlose Acetabulariazelle, wie BRACHET und SZAFARZ (1953) aufgrund des Einbaus von Orotsäure und BRACHET (1957) aufgrund der Experimente über die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung in kernlosen Zellen vermutet (bereits)haben.

Die Definition für den Begriff "Turnover" (s.o.) umschließt zwei Prozesse, die Synthese und den Abbau von Protein; entsprechend können die am häufigsten angewendeten Methoden zur Bestimmung des Turnover gegliedert werden (Übersicht s. HUFFAKER und PETERSON 1974). Der gleichzeitige Ablauf beider Prozesse wirft spezifische Meßprobleme auf, besonders dann, wenn die Synthese- und Abbaurrate nicht mit gleicher Intensität ablaufen.

Die vorliegende Untersuchung beschränkt sich in ihren Aussagen über den Turnover kernloser Zellen und ihrer Chloroplasten auf Meßdaten, die sich aus dem Abbau des Proteins ergeben. Diese Interpretation muß aber im Zusammenhang mit den Vorstellungen über die Syntheserate kernloser Zellen betrachtet werden.

Um Einblick in den Turnover zu gewinnen, wurden zwei Methoden angewendet: (1) Bestimmung des relativen Turnover nach Doppelmarkierung des Proteins (im folgenden als Methode 1 bezeichnet); (2) Bestimmung der Turnoverzeit nach Markierung des Proteins mit ^{14}C -Leucin und mit $^{14}\text{CO}_2$ über die Photosynthese (im folgenden als Methode 2 bezeichnet).

Bei beiden Methoden wird die Abnahme der Radioaktivität im Protein gemessen, nachdem der markierte Precursor aus dem Kulturmedium entfernt wurde. Die Bestimmung

erfordert demnach wenigstens zwei Meßvorgänge, nämlich kürzere und längere Zeit nach der Inkubation mit der markierten Vorstufe.

Wie unter Ergebnisse 3.1.1 ausgeführt, werden nach Methode 1 die beiden Meßpunkte dadurch zusammengelegt, daß dieselbe Vorstufe mit unterschiedlicher Markierung geboten wird (ARIAS et al. 1969; GLASS und DOYLE 1972). Das zuerst verabreichte ^{14}C -Leucin stellt den zweiten, das später verabreichte ^3H -Leucin stellt den ersten Meßpunkt in der Abnahmekurve dar (Abb. 1).

Die Geschwindigkeit des Turnover wird durch das $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis ausgedrückt, ein hohes $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis zeigt im Vergleich zu einem niedrigeren höheren Turnover an. Diese relativ einfache Methode - spezifische Schwierigkeiten, die in der Meßtechnik doppelmarkierter Proben begründet sind (TURNER 1969 b), außera-chtgelassen - ist immer dann von Nutzen, wenn verschiedene Organellsysteme in einem Organismus oder gleiche Organismen unter verschiedenen Bedingungen verglichen werden sollen. Die Aussagekraft dieser Methode ist insofern begrenzt, da sie nur Vergleichswerte liefert, d. h. ob der Turnover unterschiedlich abläuft. Mit dieser Methode kann jedoch nicht erfaßt werden, ob Synthese- oder Abbaurate oder gar beide Prozesse den unterschiedlichen Ablauf hervorrufen. Sie gibt zudem keine absolute Turnoverzeit oder Turnoverrate an.

Die mit Methode 1 erzielten Ergebnisse legen nahe, für das Chloroplastenprotein kernloser Zellen von Acetabularia einen höheren Turnover anzunehmen, verglichen mit dem kernhaltiger Zellen (Tab. 3 und 4).

Bei Methode 2 wurde die Abnahme der Radioaktivität im Protein der Zellen und ihrer Chloroplasten durch sukzedane Messungen über 11 - 17 Tage direkt verfolgt. Im Gegensatz zu Methode 1 konnte mit dieser Methode annähernd gleicher Turnover im Chloroplastenprotein kernloser und kernhaltiger Zellen festgestellt werden - eine Ausnahme bildet lediglich das Ergebnis von Versuch 4 (Tab. 9).

Die divergierenden Ergebnisse sind umso überraschender, als die beiden Methoden auf dem gleichen Prinzip beruhen, nämlich der Messung der Abnahme der Radioaktivität im Protein, die durch den Abbau bedingt ist. Wenn nach der Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse gefragt wird, müssen die Faktoren betrachtet werden, die Turnovermessungen beeinflussen. Die Grenzen der verschiedenen Meßmethodik können dadurch gleichzeitig aufgezeigt werden.

(1) Die Untersuchungen bezogen sich ausschließlich auf das Gesamtprotein der Chloroplasten bzw. Zellen und nicht auf individuelle Proteine oder Enzyme. Für das "heterogene" Protein ergibt sich dementsprechend ein Durchschnittswert, der sich aus den Turnoverzeiten der individuellen Proteine zusammensetzt (SWICK 1958; MANDELSTAM 1960).

(2) Die Inkubationsdauer hat bei der Messung eines "heterogenen" Proteins einen ungleich stärkeren Effekt auf das Ergebnis als bei der Messung eines individuellen Proteins. Während bei kurzer Markierung labile Proteine relativ mehr einbauen als ihrem prozentualen Anteil im Gesamtprotein entspricht, werden nach längerer Markierung auch die stabileren Proteine Radioaktivität aufweisen (AUSTIN et al. 1972). Die unterschiedliche Inten-

sität der Markierung labiler und stabiler Proteine führt zu steileren oder flacheren Abnahmekurven bzw. zu Abnahmekurven mit mehr als einer Steigung (OMURA et al. 1967). SWICK (1958) wies nach, daß mit der Verlängerung der Expositionsdauer die gemessene Halbwertszeit des Proteins von Rattenleber sich verdoppelte.

Da bei den vorliegenden Untersuchungen die erste Chloroplastenisolierung nicht direkt nach der Inkubation mit radioaktivem Material vorgenommen wurde, muß die anschließende Kultivierungsdauer im kalten Medium berücksichtigt werden. Der Vergleich zwischen Versuch 1 und 2 einerseits mit Versuch 4 andererseits (Tab. 9 Abb. 9a, b, d) macht den Einfluß des Zeitpunkts der ersten Chloroplastenisolierung deutlich (Versuch 3 wird wegen seines atypischen Ergebnisses, das möglicherweise auf ungünstige Kulturbedingungen zurückzuführen ist (TREWAVAS 1972), ausgeklammert). Wenn die Isolierungsserie bereits sechs Stunden nach dem Inkubationsende begann (Versuch 4, Tab. 9), wurde für das Chloroplastenprotein der kernlosen Zellen eine sehr kurze Turnoverzeit berechnet. Bei den kernhaltigen Zellen hingegen konnte zwischen den ersten beiden Meßpunkten kein Turnover festgestellt werden. Bilden die folgenden beiden Meßpunkte die Basis für die Berechnung, ergeben sich ähnliche Werte wie in den Versuchen 1 und 2.

(3) Dieses Ergebnis zeigt ein weiteres Problem auf, das berücksichtigt werden muß, wenn der Zeitpunkt für die erste Chloroplastenisolierung nach der Inkubation entschieden wird: der Transfer der Markierung vom Cytoplasma in die Organellen. Die übereinstimmende spezifische Aktivität des Chloroplastenproteins kernhaltiger Zellen bei den ersten beiden Messungen im Versuch 4 (Tab. 9, Abb. 9d) macht deutlich, daß der Transport des ^{14}C vom

Cytoplasma in die Plastiden bei der ersten Isolierung noch andauerte, daß bei der zweiten Isolierung hingegen die Markierung bereits abgenommen hatte. Im Gegensatz dazu befand sich die Markierung der Chloroplasten kernloser Zellen schon vom Beginn der ersten Isolierung an in der Abnahmephase.

Die Unterschiede im Transfer zwischen kernlosen und kernhaltigen Zellen, die dieser Versuch anzeigt, könnten verschiedener Natur sein. Ein wichtiger Faktor sind sicherlich die Poolgrößen der löslichen Aminosäuren im Cytoplasma, deren Bedeutung verschiedentlich betont wurde (Übersicht s. OAKS und BIDWELL 1970). Darüberhinaus ist denkbar, daß verschiedene Pools der gleichen Aminosäure existieren (PAYER 1969; TREWAVAS 1972), die sich in ihrer Stabilität unterscheiden (STEWART et al. 1966). Die Akkumulation löslicher Stickstoffverbindungen (BRACHET et al. 1955) wie NH_4 -Ionen (BREMER und SCHWEIGER 1960) und Aminosäuren (BREMER et al. 1962) in kernlosen Teilen deutet darauf hin, daß die Transportmöglichkeit vom Cytoplasma in die Organellen und/oder die Kapazität der Nutzung angebotener Aminosäuren begrenzt ist.

Der unterschiedliche Transfer der Markierung vom Cytoplasma in die Plastiden könnte eine der Ursachen sein, daß mit den beiden Methoden trotz gemeinsamer Basis unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Ein weiterer Grund ist im Kurvenverlauf zu sehen, der nicht die erwartete lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der spezifischen Aktivität und der Zeit zeigt. Abb. 12 und 13 zeigen im Modell, wie durch den Zeitpunkt der ersten Chloroplastenisolierung das Ergebnis bei Methode 1 und 2 unterschiedlich beeinflusst wird, wenn Transfer und Verlauf der Kurve berücksichtigt

werden. Wird Methode 1 (Abb. 12) für die Aussage, ob im Chloroplastenprotein kernloser und kernhaltiger Zellen die gleiche Turnovergeschwindigkeit vorliegt, gewählt, ist der Zeitpunkt der Chloroplastenisolierung in weiteren Grenzen wählbar. Zwar verschieben sich die numerischen Werte, die Differenz zwischen den Messungen kernloser und kernhaltiger Zellen bleibt jedoch erhalten. Im Modellbeispiel ist das $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis kernloser Zellen stets etwas niedriger als das kernhaltiger Zellen. Anders bei Methode 2 (Abb. 13): die Messungen können, wenn sie zu verschiedenen Zeitpunkten angesetzt werden, entgegengesetzte Ergebnisse liefern; werden sie zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt, ist der Turnover bei kernlosen Zellen höher als bei kernhaltigen Zellen; werden sie dagegen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt, ist er bei kernlosen Zellen niedriger als bei kernhaltigen Zellen.

Abb. 12: Modell des Kurvenverlaufs nach Doppelmarkierung, wenn Transfer der Markierung vom Cytoplasma in die Chloroplasten und die nicht-lineare Abnahmekinetik der Markierung berücksichtigt wird. Angegeben ist das $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ -Verhältnis in relativen Werten; bei beiden Meßpunkten wird sich ein niedrigerer relativer Turnover ergeben, wenn kein Transfer angenommen wird.

Abb. 13: Modell des Kurvenverlaufs nach Einfachmarkierung, wenn Transfer der Markierung vom Cytoplasma in die Chloroplasten und die nicht-lineare Abnahmekinetik der Markierung berücksichtigt wird. Wenn die Differenz 1 Basis zur Berechnung der Turnoverzeit ist, wird eine kürzere Zeit berechnet werden, wenn kein Transfer stattfindet, bei Differenz 2 hingegen eine längere Zeit, verursacht durch die verschiedenen Steigungen in der Abnahmekurve.

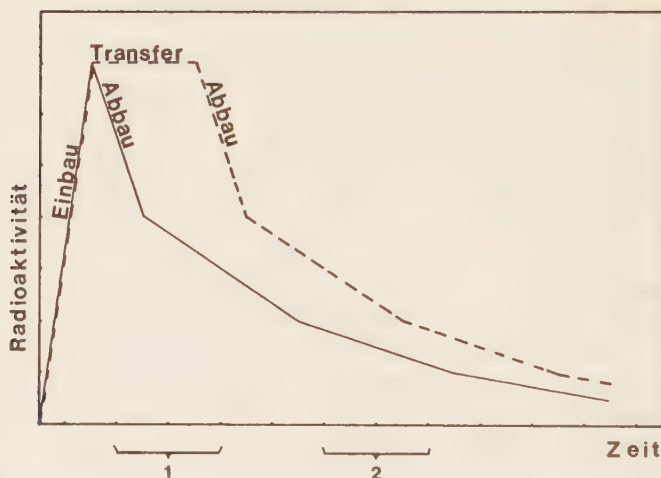


Abb. 13: Theoretischer Kurvenverlauf nach Einfach-markierung;
Legende S. 75. Einbau und direkt anschließender Abbau. (—)
Einbau und verzögerter Abbau durch Transfer der Markierung vom Cytoplasma in die Plastiden (-----)

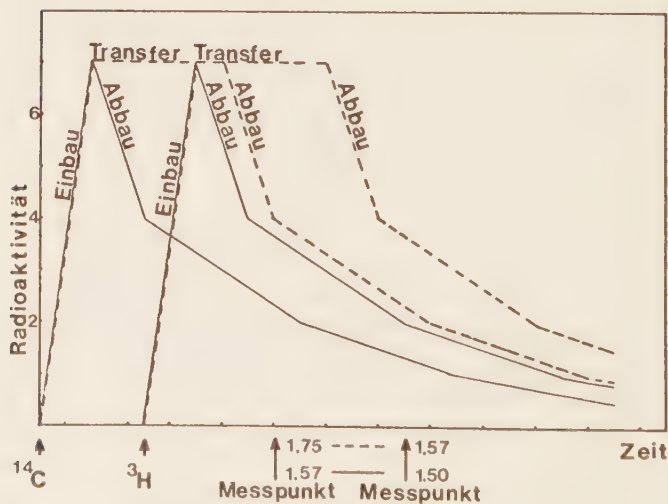


Abb. 12: Theoretischer Kurvenverlauf nach Doppelmarkierung;
Legende S. 75.
Einbau und direkt anschließender Abbau. (—)
Einbau und verzögerter Abbau durch Transfer der Markierung vom Cytoplasma in die Plastiden. (-----)

Wenig kann zur Zeit über die Form des Transfers vom Cytoplasma in die Chloroplasten ausgesagt werden. Die hohen Einbauraten nach Kurzzeitmarkierung im Gesamtprotein im Vergleich zu den Chloroplasten (Tab. 5) unterstreichen allerdings die unterschiedliche Syntheseintensität von Cytoplasma und Plastiden. Es gibt zudem eine Reihe von Ergebnissen, die die kernabhängige Synthese von Chloroplastenproteinen aufzeigten (SCHWEIGER et al. 1967; REUTER und SCHWEIGER 1969; APEL und SCHWEIGER 1972; APEL und SCHWEIGER 1973). KLOPPSTECH und SCHWEIGER (1973b) konnten mit Hemmstoffen nachweisen, daß zumindest die Proteine der 44S Unterheit der Chloroplastenribosomen an 80S Ribosomen codiert werden. Wenn nicht zwei Ribosomen"typen" (80S und 70S) in den Plastiden angenommen werden - der Nachweis ist bis jetzt noch nicht eindeutig gelungen (APEL und SCHWEIGER 1973) - muß der Ort für die Synthese dieser Proteine im Cytoplasma liegen.

Je dichter die Hinweise für eine - direkt oder indirekt - kernabhängige Proteinsynthese werden, umso verständlicher wird auch (1) die niedrige Proteinsyntheserate in isolierten Chloroplasten und (2) die übereinstimmenden Ergebnisse für die Chloroplasten aus kernhaltigen und kernlosen Zellen (Tab. 8). Die Synthesekapazität für Proteine in isolierten Chloroplasten ist offensichtlich geringer, als aufgrund der Angaben von GOFFEAU und BRACHET (1965) und GOFFEAU (1969) angenommen werden konnte. Nach den vorliegenden Informationen dürften die hohen Werte dieser Autoren z. T. auf cytoplasmatische Verunreinigungen zurückzuführen sein (s. WOODCOCK und BOGORAD 1971). Die niedrigen Einbauraten werden andererseits durch die Untersuchungen von SHEPHARD und LEVIN (1972) bestätigt, die - wohl aufgrund unzureichender Meßempfindlichkeit - keinen Einbau markierter

Aminosäuren in das Chloroplastenprotein feststellen konnten. Die Fähigkeit zur Proteinsynthese dieser Chloroplastenpräparationen zeigte sich aber dadurch, daß ^{14}C -Markierung im Protein nach $^{14}\text{CO}_2$ -Photosynthese festgestellt werden konnte.

Wie bereits verschiedentlich betont, ist die Autonomie der Chloroplasten begrenzt, obgleich sie über einen eigenen genetischen Apparat verfügen (Übersichten s. GOODWIN 1966 und 1967; SMILLIE und SCOTT 1969; GIBBS 1971;). Die Synthesekapazität der Organellen unterliegt im System "Zelle" aber Regelmechanismen, die offensichtlich durch Rückkopplungsprozesse im Zusammenhang mit dem Plasma gesteuert werden (HÄMMERLING 1958).

Es konnte nicht Absicht der vorliegenden Arbeit sein, eine schlüssige Antwort auf die komplexe Frage nach diesen Regelmechanismen zu geben. Als eine Möglichkeit zur Steuerung muß der Turnover in Betracht gezogen werden, den, wie erwartet, auch die Proteine kernloser Zellen und ihrer Chloroplasten trotz stornierter Nettosynthese aufweisen. Wie dieser Prozeß detailliert abläuft, wo im Ablauf Unterschiede zwischen kernhaltigen und kernlosen Zellen liegen, werden erst die Untersuchungen ergeben, die sich mit spezifischen Proteinen der Chloroplasten beschäftigen (s.u.).

Einen ersten Hinweis auf einen unterschiedlichen Ablauf des Turnover gibt das bei kernlosen Zellen stärker auftretende Recycling der Markierung (Abb. 9, Versuch 2), d.h. Wiedereinbau der Abbauprodukte der markierten Substanz, wie der Anstieg der Radioaktivität vermuten läßt. Dieser Wiedereinbau in das neusynthetisierte Protein scheint sich mit der Dauer der Kernentfernung zu verstärken. Er ist gleichzeitig ein weiterer Beweis, daß

Synthese im kernlosen System auch nach dem Erliegen der Nettosynthese stattfindet.

Der Wiedereinbau macht ein weiteres Problem deutlich. Bei der Betrachtung der Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß die gemessene Abbaurate geringer als die aktuelle Rate sein kann (SCHIMKE und DOYLE 1970; POOLE et al. 1969). Durch den Wiedereinbau wird die Steigung der Abnahmekurve flacher, was bei kernlosen Zellen beispielsweise zu längeren Turnoverzeiten führt, als tatsächlich vorliegen. Die besondere Problematik ergibt sich aus der Tatsache, daß das Recycling erst durch das erneute Ansteigen der spezifischen Aktivität im Protein deutlich wird.

Im Zusammenhang damit erhebt sich die Frage nach dem geeigneten Precursor für die Proteinmarkierung. Unter Berücksichtigung des möglichen Wiedereinbaus sollte eine Aminosäure gewählt werden, die Endglied im Aminosäurestoffwechsel ist (BRODA 1970). Leucin schien bei diesem Objekt geeignet, da es im Vergleich mit anderen Aminosäuren gut eingebaut wird und einen hohen Anteil im Aminosäurespektrum der Chloroplasten ausmacht (GOFFEAU 1969), zugleich aber geringen Metabolismus zeigt (HOLLEMAN und KEY 1967). Der gute Einbau kann natürlich den Nachteil mitsichbringen, daß diese Aminosäure ebensogut wiedereingebaut wird, wenn sie als Abbauprodukt des markierten Proteins in der Zelle vorliegt.

Die Versuche zur Bestimmung der Turnoverzeit nach $^{14}\text{CO}_2$ -Markierung über Photosynthese zeigten andererseits, daß Recycling keineswegs typisch für die Leucinmarkierung ist. Da durch Bicarbonat

ein breites Aminosäurespektrum markiert wird (SHEPHARD und LEVIN 1972), muß dieser Effekt als generell auftretendes Phänomen aufgefaßt werden. Das Ausmaß des Einbaus und entsprechend Wiedereinbaus dürfte allerdings von Aminosäure zu Aminosäure differieren, entsprechend unterschiedliche Werte müssen bei der Anwendung verschiedener Precursor erwartet werden (POOLE et al. 1969, TREWAVAS 1972).

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß in kernlosen Zellen und ihren Chloroplasten selbst vier Wochen nach der Entfernung des Kerns Proteinturnover stattfindet. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Turnoverzeit des Chloroplastenproteins kernhaltiger und kernloser Zellen unterschiedlich ist, da die in dieser Untersuchung verwendeten Bestimmungsmethoden divergierende Ergebnisse brachten. Dementsprechend kann erst nach der Beantwortung dieser Frage erneut die alternative Überlegung aufgegriffen werden, ob die Veränderung der Turnoverzeit ursächliches Regulativ für die Sistierung der Proteinnettosynthese in kernlosen Zellen ist oder eine Folgeerscheinung.

Um diese noch offene Frage zu klären, scheint es ausfolgenden Gründen sinnvoll - als Konsequenz der durchgeführten Experimente - weitere Untersuchungen an individuellen Chloroplastenproteinen vorzunehmen. Für einige Enzyme ist bekannt, daß ihre Aktivität in kernlosen Zellen zunächst wie in kernhaltigen ansteigt, dann aber mit der Dauer der Kernentfernung nachläßt (BALTUS 1955; KECK und CLAUSS 1958; CLAUSS 1959). Interessant ist dabei, daß die Aktivitätszunahme der Phosphorylase in der Chloroplastenfraktion kernloser Hinterstücke bis zu drei Wochen nach der Kernentfernung anhält (CLAUSS 1959), obgleich in diesen Teilen bereits eine Woche nach der Kernentfernung die Proteinnettosynthese storniert ist (CLAUSS 1958). Ein weiteres Beispiel für die unterschiedlich stark ausgeprägte Kernabhängigkeit individueller Proteine zeigt sich darin, daß die Synthese von zwei artspezifischen Membranproteinen durch Cycloheximid, die Synthese des dritten hingegen durch Chloramphenicol gehemmt wird (AIEL 1970; AIEL und SCHWEIGER 1972).

Entsprechend der unterschiedlichen Beeinflussung individueller Proteine durch den Kern sind auch unterschiedliche Umsatzraten für die einzelnen Proteine zu erwarten. Bei der Bestimmung der Turnoverzeit des Gesamtproteins der Chloroplasten werden diese potentiellen Unterschiede jedoch negiert und dadurch nivelliert, daß die individuellen Proteine unterschiedliche Anteile im Gesamtprotein ausmachen (Übersicht s. MANDELSTAM 1960; HUFFAKER und PETERSON 1974).

Konsequenterweise sollten sich künftige Arbeiten deshalb mit der Untersuchung individueller Proteine beschäftigen. Im Hinblick auf den Vergleich zwischen kernlosen und kernhaltigen Zellen scheint es außerdem sinnvoll, zwischen kernabhängigen und kernunabhängigen Proteinen - soweit diese zur Zeit bekannt sind - zu differenzieren. Chloroplastenspezifische Proteine ließen sich zudem aufgrund elektrophoretischer, säulenchromatographischer oder immunologischer Nachweise eindeutiger definieren, als es für das Gesamtprotein möglich ist. Dafür geeignet erscheinen beispielsweise die von APEL (1970; APEL und SCHWEIGER 1972) beschriebenen Membranproteine, das von BANNWARTH (1974) charakterisierte Thymidinphosphorylierende Enzym oder das Fraktion I Protein bzw. die Ribulose -1.5-diphosphatcarboxylase (KLEINKOPF et al. 1970 a; 1970 b; Übersicht s. KAWASHIMA und WILDMAN 1970).

Durch die Untersuchung chloroplastenspezifischer, individueller Proteine wäre zudem die Möglichkeit gegeben, den Störfaktor "cytoplasmatische Verunreinigung" auszuschließen.

An die vergleichende Bestimmung der Turnoverzeit des Gesamtproteins der Chloroplasten kernhaltiger und kernloser Zellen sollte erst dann gedacht werden, wenn

Angaben über die Turnoverzeit individueller Proteine vorliegen und Versuche, die Chloroplastenpräparationen weitgehend von Cytoplasma zu befreien, erfolgreich waren. Die Aussagekraft solcher Bestimmungen sollte zudem durch die Einbeziehung der Precursorpools in die Untersuchung untermauert werden (OAKS 1965; STEWARD et al. 1958; Übersicht s. OAKS und BIDWELL 1970). Die exakteste Bestimmung der Turnoverrate wird zweifellos dann erreicht, wenn sowohl die Einbaurrate wie die Abbaurrate des Precursors in das Protein bestimmt wird und parallel dazu die Veränderung der spezifischen Aktivität des Precursor selbst.

6. ZUSAMMENFASSUNG

(1) Der Turnover des Gesamtproteins und des Chloroplastenproteins von Acetabularis mediterranea wurde verglichen; zur Bestimmung des Turnover wurde der Ausbau von ^{14}C nach Einfachmarkierung und von ^{14}C und ^3H nach Doppelmarkierung bestimmt.

(2) Im Gesamtprotein und Chloroplastenprotein kernloser Zellen findet selbst vier Wochen nach der Entfernung des Kerns Turnover statt; die Turnoverzeit des Gesamtproteins kernhaltiger und kernloser Zellen stimmt überein.

(3) Der Turnover des Chloroplastenproteins kernloser Zellen ist aufgrund der Doppelmarkierungsmethode etwas schneller als der kernhaltiger Zellen; im Gegensatz dazu wurde die gleiche oder etwas längere Turnoverzeit für das Chloroplastenprotein kernloser Zellen im Vergleich zu dem kernhaltiger Zellen bestimmt, wenn die Abnahme der Radioaktivität über einen längeren Zeitraum verfolgt wird.

(4) Mögliche Ursachen für die divergierenden Ergebnisse mit den zwei Bestimmungsmethoden werden im Zusammenhang mit der grundsätzlichen Problematik von Turnoverbestimmungen diskutiert; die Grenzen der Aussagekraft solcher Bestimmungen werden aufgezeigt und Wege zur Überwindung methodischer Schwierigkeiten vorgeschlagen.

(5) Unter in vivo Bedingungen ist die Einbaurate radioaktiv markierter Aminosäuren in "nicht-Chloroplastenprotein" intensiver als in das Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen; der Vergleich der spezifischen Aktivität zwischen Zellhomogenat und

Chloroplastenfraktionen einerseits und der Vergleich der spezifischen Aktivität der Chloroplastenfraktionen vor und nach der Auftrennung im Saccharosedichtegradienten andererseits zeigen dies deutlich.

(6) Unter in vivo Bedingungen ist der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in das Chloroplastenprotein kernhaltiger Zellen höher als in das kernloser Zellen; unter in vitro Bedingungen hingegen ist die Einbaurate in das Chloroplastenprotein kernhaltiger und kernloser Zellen gleich, aber wesentlich niedriger als unter in vivo Bedingungen.

7. LITERATUR

Apel, K. 1970:

"Kerndeterminierte Synthese von "unlöslichen" Chloroplastenproteinen in Acetabularia"

Diss. Hamburg

Apel, K. und Schweiger, H.G., 1972:

"Nuclear dependency of chloroplast proteins in Acetabularia"

Eur. J. Biochem. 25, 229-238

Apel, K. und Schweiger, H.G., 1973:

"Sites of synthesis of chloroplast-membrane proteins"

Eur. J. Biochem. 38, 373-383

Arias, J., Doyle, D. und Schimke, R.T., 1969:

"Studies on the synthesis and degradation of proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver"

J. Biol. Chem. 244, 3303-3315

Arnon, D.J. 1949:

"Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol-oxidase in Beta vulgaris"

Plant Physiol. 24, 1-15

Aronoff, S., 1956:

"Techniques of Radiobiochemistry

The Iowa State College Press

Austin, L., Lowry, O.H., Brown, J.G. und Carter, J.G. 1972:

"The turnover of protein in discrete areas of rat brain"

Biochem. J. 126, 351-359

Baltus, E., 1959:

"Evolution de l'aldolase dans les fragments anuclées d'Acetabularia"

Biochim. biophys. Acta 33, 337-339

Baltus, E. und Brachet, J. 1963:

"Presence of desoxyribonucleic acid in the chloroplasts of Acetabularia mediterranea"

Biochim. biophys. Acta 76, 490-492

Baltus, E., Edström, J.E., Janowski, M., Hanocq-Quertier, J., Tencer, R., und Brachet, J. 1968:

"Base composition and metabolism of various RNA fractions in Acetabularia mediterranea"

Proc. nat. Acad. Sci. 59, 406-413

Bannwarth, H. 1974:

"Effects of Transcription and translation inhibitors on the regulation of the thymidine phosphorylation enzyme (TPE) in Acetabularia"

in: "Third Meeting of the international research group on Acetabularia", Université Paris

Bassham, J.A., Morawiecka, B., und Kirk, M. 1964:

"Protein synthesis during photosynthesis"

Biochim. biophys. Acta 90, 542-552

Berger, S. 1967:

"RNA-Synthese in isolierten Chloroplasten von Acetabularia"

Diss., Köln

Berger, S., 1967:

"RNA-synthesis in Acetabularia. II. RNA-synthesis in isolated chloroplasts"

Protoplasma 64, 13-25

Bidwell, R.G.S., Barr, R., und Steward, F.C. 1964:

"Protein synthesis and turn-over in cultured plant tissue: sources of carbon for synthesis and the fate of the protein breakdown products"

Nature 203, 367-373

Bidwell, R.G.S. 1972:

"Impurities in preparations of Acetabularia chloroplasts"
Nature 237, 169

Bird, J.F., Cornelius, M.J., Dyer, T.A. und Keys, A.J. 1973:

"The Purity of chloroplasts isolated in non-aqueous media"
J. Exptl. Bot. 24, 211-215

Brachet, J. 1957:

Biochemical Cytology
Academic Press, New York

Brachet, J., Chantrenne, H. und Vanderhaeghe, F. 1955:

"Recherches sur les interactions biochimiques entre le
noyau et le cytoplasme chez les organismes unicellulaires"
Biochim. biophys. Acta 18, 544-563

Brändle, E.P.O. 1974:

"Der ¹⁴C-Stoffwechsel kernhaltiger und kernloser
Acetabularia-Zellen"
Diss., Tübingen

Bremer, H.J. und Schweiger, H.G. 1960:

"Das Verhalten der freien Aminosäuren in kernhaltigen
und kernlosen Acetabularien"
Biochim. biophys. Acta 56, 380-382

Broda, E. 1970:

Radioactive Isotopes in Biochemistry
Elsevier, Amsterdam

Chauduri und Spencer, 1968:

Amino acid uptake in Acetabularia
Protoplasma 66, 255-259

Clauss, H. 1958:

"Über quantitative Veränderungen der Chloroplasten- und cytoplasmatischen Proteine in kernlosen Teilen von Acetabularia mediterranea"

Planta 52, 334-350

Clauss, H. 1959:

"Das Verhalten der Phosphorylase in kernhaltigen und kernlosen Teilen von Acetabularia mediterranea"

Planta 52, 534-542

Clauss, H. und Werz, G. 1961:

"Über die Geschwindigkeit der Protein-Synthese in kernlosen und kernhaltigen Zellen von Acetabularia"

Z. Naturforschg. 16b, 162-165

Cooper, T.G. und Beevers, H. 1969:

"Mitochondria and glyoxysomes from Castor Bean endosperm"

J. Biol. Chem. 244, 3507-3513

Gibbs, M. Ed. 1971:

Structure and function of chloroplasts

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Gibor, A. and Izawa, M. 1963:

"The DNA content of the chloroplasts of Acetabularia"

Proc. nat. Acad. Sci. 50, 1164-1169

Glass, R.D. und Doyle, D. 1972:

"On the measurement of protein turnover in animal cells"

J. Biol. Chem. 247, 5234-5242

Goffeau, A. 1969:

"Incorporation of amino acids into the soluble and membrane bound proteins of chloroplasts isolated from enucleated Acetabularia"

Biochim. biophys. Acta 174, 340-350

Goffeau, A. und Brachet, J. 1965:

"Deoxyribonucleic acid-dependent incorporation of amino acids into the proteins of chloroplasts isolated from anucleate Acetabularia fragments"

Biochim. biophys. Acta 25, 302-313

Goodwin, T.W. Ed. 1966:

Biochemistry of chloroplasts, Vol. I

Academic Press, New York

Goodwin, T.W. Ed. 1967:

Biochemistry of chloroplasts, Vol. II

Academic Press, New York

Hahn, F.E., Puck, T.T. und Springer, G.F. 1969:

"Progress in molecular and subcellular biology", Vol I
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Haarwood, R. 1974:

"Cell Separation by Gradient Centrifugation"

Int. Rev. Cytol. 38, 369-403

Hämmerling, J. 1931:

"Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea"

Biol. Zentralblatt 51, 633-647

Hämmerling, J. 1932:

"Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea"

Biol. Zentralblatt 52, 42-61

Hämmerling, J. 1934:

"Über formbildende Substanzen bei Acetabularia mediterranea, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft"

Wilhelm Roux Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen 131, 1-81

Hämmerling, J. 1958:

"Über die wechselseitige Abhängigkeit von Zelle und Kern"

Z.Naturforschg. 13b, 440-448

Hämmerling, J. 1963:

"Nucleo-cytoplasmic interactions in Acetabularia and other cells"

Ann. Rev. Plant Physiol. 14, 65-92

Hämmerling, J., Clauss, H., Keck, K., Richter, G. und Werz, G. 1958:

"Growth and protein synthesis in nucleated and anucleated cells"

Exptl. Cell Res., Suppl. 6, 210-226

Heber, U. 1960:

"Vergleichende Untersuchungen an Chloroplasten, die durch Isolierungs-Operationen in nichtwässrigem und in wässrigem Milieu erhalten wurden".

Z. Naturforschg. 15b, 100-109

Heber, U. 1962:

"Protein synthesis in chloroplasts during photosynthesis"

Nature 195, 91-92

Heber, U., Hallier, U.W. und Hudson, M.A. 1967:

"II. Lokalisation von Enzymen des reduktiven und dem oxydativen Pentosephosphat-Zyklus in den Chloroplasten und Permeabilität der Chloroplasten-Membran gegenüber Metaboliten"

Z. Naturforschg. 22b, 1200-1215

Holleman, J.H. and Key, J.L. 1967:

"Inactive and protein precursor pools of amino acids in the soybean hypocotyl"

Plant Physiol. 42, 29-36

- Hoursiangou-Neubrun und Puiseux-Dao, S. 1974:
"Modifications du gradient apicobasal de la population
plastidiale chez l'Acetabularia mediterranea"
Plant Science letters 2, 209-219
- Issinger, O., Maaß, I. und Clauss, H. 1971:
"Photosyntheseintensität der Stielregionen von
Acetabularia mediterranea"
Planta 101, 360-364
- Jacobi, G. 1974:
Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle
Thieme Verlag, Stuttgart
- Kawashima, N. und Wildman, S.G. 1970:
"Fraction I Protein"
Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 325-358
- Keck, K. 1969:
"Metabolism of enucleated cell"
Intern. Rev. Cytol. 26, 191-233
- Keck, K. und Clauss, H. 1958:
"Nuclear control of enzyme synthesis in Acetabularia"
Bot. Gaz. 120, 43-49
- Kleinkopf, G.E., Huffaker, R.C. und Matheson, A. 1970:
"A simplified purification and some properties of
ribulose 1.5-diphosphate carboxylase from Barley"
Plant Physiol. 46, 204-207
- Kleinkopf, G.E., Huffaker, R.C. und Matheson, A. 1970:
"Light-induced de novo synthesis of ribulose 1.5-diphos-
phate carboxylase in greening leaves of Barley"
Plant Physiol. 46, 416-418

- Kloppstech, K. und Schweiger, H.G. 1973a:
"Synthesis of chloroplast and cytosol ribosomes in
regenerating Acetabularia cells"
Differentiation 1, 331-337
- Kloppstech, K. und Schweiger, H.G. 1973b:
"Nuclear genome codes for chloroplast ribosomal proteins
in Acetabularia. I. Isolation and characterization of
chloroplast ribosomal particles"
Exptl. cell Rex. 80, 63-68
- Kloppstech, K. und Schweiger, H.G. 1973c:
"80-S ribosomes from Acetabularia"
Biochim. biophys. Acta 324, 365-374
- Laycock, M.V., Boulter, D. und Thurman, D.A. 1966:
"Purification of Vicia faba chloroplasts by density
gradient centrifugation and an investigation of some
of their associated proteins"
in: Biochemistry of Chloroplasts, Vol. I, 293-298,
ed. by T.W. Goodwin
Academic Press, New York
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951:
"Protein measurement with the Folin phenol reagent"
J. biol. Chem. 193, 265-275
- Lyttleton, J.W., Ballantine, J.E.H. und Forde, B.J. 1971:
"Development and environment studies on chloroplasts of
Amaranthus lividus"
in: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts,
ed. by N.K. Boardman, A.W. Linnane und R.L. Smillie
North-Holland 1971
- Mandelstam, J. 1960B
"The Intracellular turnover of protein and nucleic acids
and its role in biochemical differentiation"
Bacteriol. Rev. 24, 289-308

Nomoto, M., Narahashi, Y. und Murakami, M. 1960:

"A proteolytic enzyme of Streptomyces griseus.

VI. Hydrolysis of protein by Streptomyces griseus protease"

J. Biochem. 48, 593-602

Oaks, A. 1965:

"The effect of leucine on the biosynthesis of leucine
in Maize root tips"

Plant Physiol. 40, 149-155

Oaks, A. und Bidwell, R.G.S. 1970:

"Compartmentation of intermediary metabolites"

Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 43-66

Okita, G.T., Kabara, J.J., Richardson, F. und Le Roy,
G.B. 1957:

"Assaying compounds containing H^3 and C^{14} "

Nucleonics 15, 111-114

Olson, A.C., White, L.M. and Noma, A.T. 1968:

"Scintillation counting of the ninhydrin-amino acid-
 C^{14} reaction products from an automatic amino acid analyzer"

Anal. Biochem. 24, 120-127

Omura, T., Siekevitz, P. und Palade G. E. 1967:

"Turnover of constituents of the endoplasmic reticulum
membranes of rat hepatocytes"

J. Biol. Chem. 242, 2389-2396

Payer, H.D. 1969:

"Untersuchungen zur Kompartimentierung der freien
Aminosäure Alanin in den Farnvorkeimen von Dryopteris
filix-mas (L.) Schott im Rotlicht und im Blaulicht"

Planta 86, 103-115

Payer, H.D., Sottriffer, U. und Mohr, H. 1969:

"Die Aufnahme von $^{14}\text{CO}_2$ und die Verteilung des ^{14}C auf freie Aminosäuren und auf Proteinaminosäuren im Hellrot und im Blaulicht. (Objekt: Farnvorkeime von *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott)

Planta 85, 270-283

Pine, M.J. 1966:

"Metabolic control of intracellular proteolysis in growing and resting cells of *Escherichia coli*"

J. Bacteriol. 92, 847-850

Poole, B., Leighton, F. and De Duve, Ch. 1969:

"The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes.

II. Turnover of peroxisomes protein"

J. Cell. Biol. 41, 536-546

Puiseux-Dao, S. 1970a:

"Biologie moléculaire - le problème du contrôle nucléaire du fonctionnement des plastes chez l'*Acetabularia*"

C.R. Acad. Sc. Paris 270, 358-361

Puiseux-Dao, S. 1970b:

Acetabularia and cell biology

Logos Press, London

Puiseux-Dao, S. und Dazy, A.-C. 1970:

"Plastid structure and the evolution of plastids in *Acetabularia*"

in: Biology of *Acetabularia*, Ed. by J. Brachet und S. Bonotto
Academic Press, New York, London

Racusen, D. und Foote, H. 1960:

"Amino acid turnover and protein synthesis in leaves"

Arch. Biochem. Biophys. 90, 90-95

Reuter, W. und Schweiger, H.G. 1969:

"Kernkontrollierte Lactatdehydrogenase in *Acetabularia*"

Protoplasma 68, 357-368

Richter, G. 1958:

"Das Verhalten der Plastidenpigmente in kernlosen Zellen und Teilstücken von Acetabularia mediterranea"
Planta 52, 259-275

Richter, G. 1963:

"Die Tagesperiodik der Photosynthese bei Acetabularia und ihre Abhängigkeit von Kernaktivität, RNS- und Protein-Synthese"

Z. Naturforschg. 18, 1085-1089

Ritenour, G.L., Joy, K.W., Bunning, J. und Hageman, R.H. 1967:

"Intracellular localization of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamic acid dehydrogenase in green leaf tissue"

Plant Physiol. 42, 233-237

Santarius, K.A. und Stocking, C.R. 1969:

"Intracellular localization of enzymes in leaves and chloroplast membrane permeability to compounds involved in amino acid synthesis"

Z.Naturforschg. 24b, 1170-1179

Schimke, R.T. und Doyle, D. 1970:

"Control of enzyme levels in animal tissues"

Ann. Rev. Biochem. 39, 929-976

Schweiger, H.G. 1969:

"Cell Biology of Acetabularia"

C.T. in Microbiology 50, 1-36

Schweiger, H.G., Laster, R.W.P. und Werz, G. 1967:

"Nuclear control of a cytoplasmic enzyme in Acetabularia"

Nature 216, 554-557

Shephard, D. 1965:

"An autoradiographic comparison of the effects of enucleation and actinomycin D on the incorporation of nucleic acids and protein precursors by Acetabularia mediterranea"

Biochim. biophys. Acta 108, 635-643

Shephard, D. und Levin, W.B. 1972:

"Biosynthesis in isolated Acetabularia chloroplast.

I. Protein amino acids"

J. Cell Biol. 54, 279-294

Siekevitz, Ph. 1972:

"The turnover of proteins and the usage of information"

J. theor. Biol. 37, 321-334

Smillie, R.M. und Scott, N. St. 1969:

"Organelle biosynthesis: the chloroplast"

in: Progress in molecular and subcellular biology,

Ed. by F.E. Hahn, T.T. Puck, G.F. Springer und K. Wallenfels

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Solomon, A. K. 1949:

"Equations for tracer experiments"

J. clin. Invest. 28, 1297-1307

Steward, F.G., Bidwell, R.G.S. und Yemm, E.W. 1958:

"Nitrogen metabolism, respiration, and growth of cultured plant tissue"

J. Exptl. Bot. 9, 11-49

Steward, F.G. und Bidwell, R.G.S. 1966:

"Storage pools and turnover systems in growing and non-growing cells: Experiments with ¹⁴C-sucrose, ¹⁴C-glutamine, and ¹⁴C-asparagine"

J. Exptl. Bot. 17, 726-741

Swick, R.W. 1958:

"Measurement of protein turnover in rat liver"

J. Biol. Chem. 231, 751-764

Thalacker, R. und Behrens, M. 1959:

"Über den Reinheitsgrad der in einem nichtwässrigen
spezifischen Gewichtsgradienten gewonnenen Chloroplasten"

Z. Naturforschg. 14b, 443-446

Trewavas, A. 1972:

"Control of the protein turnover rates in Lemna minor"

Plant Physiol. 49, 47-51

Turner, J.C. 1968:

"Triton X-100 scintillant for carbon - 14 labelled
materials"

Int. J. appl. Radiat. Isotopes 19, 557-563

Turner, J.C. 1969 a:

"Tritium Counting with the Triton X-100 scintillant"

Int. J. appl. Radiat. Isotopes 20, 499-505

Turner, J.C. 1969 b:

"Determination of Counting Efficiency"

in: Techniques in Protein Biosynthesis, Vol. 3,
ed. by P.N. Campbell und J.R. Sargent

Academic Press, New York

Warburg, O., Geissler, A.W. und Lorenz, S. 1961:

"CO₂-Drucke über Bicarbonat-Carbonatgemischen"

Z. Naturforschg. 16b, 283

Werz, G. 1957:

"Membranbildung bei kernlosen, wachsenden und nicht
wachsenden Teilen von Acetabularia mediterranea"

Z. Naturforschg. 12b, 739-740

Werz, G. und Streitbürger, E. 1973:

"Strukturelle Aspekte der Morphogenese"

in: Vom Gen zum Genus, Pressedienst Wissenschaft 3,
FU Berlin

Winkenbach, F., Parthasarathy, M.V. und Bidwell,
R.G.S. 1972:

"Sites of photosynthetic metabolism in cells and
chloroplast preparations of Acetabularia mediterranea"

Can. J. Bot. 50, 1367-1375

Woodcock, C.L.F. und Bogorad, L. 1970:

"Evidence for variation in the quantity of DNA among
plastids of Acetabularia"

J. Cell Biol. 44, 361-375

Woodcock, C.L.F. und Bogorad, L. 1971:

"Nucleic acids and information processing in chloroplasts"

in: Structure and function of chloroplasts, ed. by M. Gibbs
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Zetsche, K. 1965:

"Entkopplung morphogenetischer Prozesse in Acetabularia
mediterranea durch P-Fluorphenylalanin"

Planta 68, 360-370

Zetsche, K. 1968:

"Regulation der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität in
Acetabularia. I. Morphogenese und UDPG-Pyrophosphorylase-
Synthese in kernhaltigen und kernlosen Zellen"

Z. Naturforschg. 23b, 369-376

Zetsche, K., Grieninger, G.E. und Anders, J. 1970:

"Regulation of enzyme activity during morphogenesis of
nucleate and anucleate cells of Acetabularia"

in: Biology of Acetabularia, ed. by J. Brachet und S. Bonotto
Academic Press, New York, London

Zetsche, K., Brändle, E.P.O. und Streicher, K. 1972:
"Photosynthesis in nucleate and anucleate cells of
Acetabularia: The pathway of carbon"
in: Biology and radiobiology of anucleate systems II,
Plant Cells, ed. by S. Bonotto, R. Gouthier, R. Kirchman,
J. R. Maisin
Academic Press, New York, London

Herrn Professor CLAUSS danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und den hilfreichen Diskussionen während der Durchführung der Experimente und der Anfertigung des Manuskripts.

Frau ARTELT gebührt Dank für die sorgfältige Betreuung der Kulturen.

Ferner danke ich für die technische Unterstützung, die ich durch verschiedene Mitarbeiter des Instituts erhielt.

Diese Arbeit wurde im Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der FU Berlin unter der Anleitung von Herrn Professor CLAUSS durchgeführt.

Lebenslauf

Angela Lüttke, geb. Buschmann

5. 8. 43 geboren in Berlin
- 1949 - 1955 9. Grundschule in Berlin
- 1955 - 1962 Hildegard Wegscheider Gymnasium in Berlin,
abgeschlossen mit dem Abitur
- 1962 - 1969 Studium an der FU Berlin: Biologie, Chemie,
Pädagogik
- 1966 - 1969 Studentische Hilfskraft am Institut für
Pflanzenphysiologie der FU Berlin
13. 2. 1969 Staatsexamen in Biologie, Chemie, Pädagogik
Experimentelle Arbeit mit dem Thema:
"Untersuchungen über die Autonomie der
Chloroplasten in Zellen von
Acetabularia mediterranea"
23. 2. 1969 Eheschließung mit Cornelius Lüttke
- 1969 - 1970 Wissenschaftliche Assistentin mit Teilzeitvertrag
am Institut für Pflanzenphysiologie der FU Berlin
- seit 1. 5. Wissenschaftliche Assistentin am Institut für
1970 Pflanzenphysiologie und Zellbiologie
der FU Berlin
- Anfertigung der Dissertation unter Anleitung
von Herrn Prof. Dr. H. Clauss

